

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 28 septembre 2015

Sophie TARDOSKI

Traitement des métastases osseuses par association d'un bisphosphonate avec des ultrasons de faible intensité

INSERM U1032 : Laboratoire des Applications Thérapeutiques Ultrasonores

INSERM U1033 : Physiopathologie, Diagnostic et Traitement des Pathologies Osseuses

Thèse dirigée par le Docteur David Melodelima

Thèse co-dirigée par le Docteur Philippe Clézardin

MEMBRES DU JURY

Monsieur le Docteur Philippe CLEZARDIN	Co-directeur de thèse
Monsieur le Professeur Marc COLOMBEL	Président du Jury
Madame le Professeur Marie-Hélène LAFAGE-PROUST	Rapporteur
Monsieur le Docteur Pascal LAUGIER	Rapporteur
Monsieur le Docteur David MELODELIMA	Directeur de thèse
Monsieur le Professeur Frédéric PATAT	Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
VICE-PRESIDENT DU CONSEIL D'ADMINISTRATION
VICE-PRESIDENT DU CONSEIL DES ETUDES ET DE LA VIE UNIVERSITAIRE
VICE-PRESIDENT DU CONSEIL SCIENTIFIQUE
DIRECTEUR GENERAL DES SERVICES

M. FRANÇOIS-NOËL GILLY
M. LE PROFESSEUR HAMDA BEN HADID
M. LE PROFESSEUR PHILIPPE LALLE
M. LE PROFESSEUR GERMAIN GILLET
M. ALAIN HELLEU

COMPOSANTES SANTE

FACULTE DE MEDECINE LYON EST – CLAUDE BERNARD
FACULTE DE MEDECINE ET DE MAÏEUTIQUE LYON SUD – CHARLES MERIEUX
FACULTE D'ODONTOLOGIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LA READAPTATION
DEPARTEMENT DE FORMATION ET CENTRE DE RECHERCHE EN BIOLOGIE HUMAINE

DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR J. ETIENNE
DIRECTEUR : MME LA PROFESSEURE C. BURILLON
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR D. BOURGEOIS
DIRECTEUR : MME LA PROFESSEURE C. VINCIGUERRA
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR Y. MATILLON
DIRECTEUR : MME. LA PROFESSEURE A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DEPARTEMENT BIOLOGIE
DEPARTEMENT CHIMIE BIOCHIMIE
DEPARTEMENT GEP
DEPARTEMENT INFORMATIQUE
DEPARTEMENT MATHEMATIQUES
DEPARTEMENT MECANIQUE
DEPARTEMENT PHYSIQUE
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES DES ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES
OBSERVATOIRE DES SCIENCES DE L'UNIVERS DE LYON
POLYTECH LYON
ECOLE SUPERIEURE DE CHIMIE PHYSIQUE ELECTRONIQUE
INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE DE LYON 1
ECOLE SUPERIEURE DU PROFESSORAT ET DE L'EDUCATION
INSTITUT DE SCIENCE FINANCIERE ET D'ASSURANCES

DIRECTEUR : M. F. DE MARCHI
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR F. FLEURY
DIRECTEUR : MME CAROLINE FELIX
DIRECTEUR : M. HASSAN HAMMOURI
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR S. AKKOUICHE
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR GEORGES TOMANOV
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR H. BEN HADID
DIRECTEUR : M. JEAN-CLAUDE PLENET
DIRECTEUR : M. Y. VANPOULLE
DIRECTEUR : M. B. GUIDERDONI
DIRECTEUR : M. P. FOURNIER
DIRECTEUR : M. G. PIGNAULT
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR C. VITON
DIRECTEUR : M. LE PROFESSEUR A. MOUGNIOTTE
DIRECTEUR : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du laboratoire LabTau, spécialisé dans les Applications Thérapeutiques des Ultrasons (INSERM UMR 1032), et du laboratoire de Physiopathologie, Diagnostic et Traitements des Maladies Osseuses (Lyos, INSERM UMR 1033).

Je souhaite ainsi remercier M. le Docteur Jean-Yves Chapelon, directeur du LabTau, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et M. le Docteur Philippe Clézardin, directeur du laboratoire Lyos et co-directeur de cette thèse, pour ses conseils, son point de vue sur les travaux réalisés et son accueil chaleureux au sein du laboratoire.

J'adresse mes profonds remerciements à David Melodelima, mon directeur de thèse pour m'avoir placée, dès mon arrivée au laboratoire en master 2, dans les meilleures conditions possibles pour mener à bien ce projet qui s'est révélé passionnant (et pour l'iMac !). L'ensemble des difficultés rencontrées au cours de cette thèse a été surmonté grâce à ton soutien, aux nombreuses discussions que nous avons eues et à ton investissement, tant sur le plan scientifique et humain, le tout dans la bonne humeur ! J'admire également ta patience, tellement plus forte que la mienne (et pourtant mise à rude épreuve, n'est-ce pas Scientific Reports !). Merci également de m'avoir encouragé à aller présenter ce travail dans de nombreux congrès, ce qui a énormément contribué à ma formation et m'a donné envie de voyager plus par la même occasion !

Je tiens à remercier sincèrement le Docteur Pascal Laugier, le Professeur Frédéric Patat et le Professeur Marie-Hélène Lafage-Proust pour avoir accepté le rôle de rapporteur de cette thèse et leurs remarques claires et constructives sur ce travail. Je remercie également le Professeur Marc Colombel d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Ce travail a été réalisé grâce à l'aide de nombreuses personnes. J'adresse mes remerciements émus à Jacqueline Ngo qui a participé à l'ensemble des études *in vivo* et qui a partagé plus de quelques 800 heures dans la salle blanche avec moi. Son calme, sa gentillesse, sa patience et son soutien ont fait que tout ce temps est finalement passé très vite et reste désormais un excellent souvenir ! Je n'oublierai pas non plus les expériences qui se sont terminées à 22h ou

le travail pendant les week-ends et les jours fériés pour lesquels elle a toujours répondu présente. L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit te doit énormément.

J'adresse également mes remerciements à Evelyne Gineyts qui a développé le dosage d'IPP et d'ApppI au tout début de ma thèse et qui a toujours été disponible pour moi tout au long de ces quatre années. Ces expériences ont été très importantes pour le déroulement du projet et se sont toujours passées dans la bonne humeur grâce à toi.

Merci à Jean-Paul Roux pour son expérience, son aide et sa disponibilité dans la réalisation de la manipulation avec le bisphosphonate fluorescent, très riche en apprentissages et en bonne humeur !

Je remercie Johnny Ribeiro « Doigts de fée, fan de Britney » pour son aide (et sa rapidité !) sur les protocoles *in vivo* et Sandra Geraci pour sa participation et sa gentillesse pendant les mêmes études. Merci à Martine Croset qui m'a donné des conseils dès mon arrivée en master 2 et a toujours pris le temps de discuter avec moi, de biologie ou d'autres choses ! J'ai appris énormément grâce à toi. Merci à Anthony Kocot pour son aide dans les manipulations *in vitro* et Jérémy Vincenot pour son aide et tous les conseils que tu as pu me donner au cours de ces quatre années de thèse. Enfin, merci à Coline Fraisseix pour avoir rendu les dernières manipulations de ma thèse sympas et motivantes.

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion d'encadrer plusieurs stagiaires. Chacune, par leur travail et leur motivation, a permis de faire avancer ce projet. Merci donc à Julie Rorteau, Sandrine Laflèche, Marion Gardette et Amélie Emanuel !

Je tiens à remercier le personnel du CIQLE, et tout particulièrement Annabelle Bouchardon, Elisabeth Errazuriz-Cerda, Christel Cassin et Chantal Thévenon pour leur disponibilité et pour avoir fait que ces longues heures passées au microscope ou au cytomètre se sont toujours passées dans la bonne humeur ! Je remercie également Nicolas Gadot et Armelle Paquet d'Anipath pour leur aide et leur patience sur les coupes histologiques qui ont également été réalisées dans une atmosphère très sympathique.

J'adresse un grand merci à tous les membres des deux laboratoires pour tous les services rendus, les conseils et apprentissages de manips, et pour toutes les interactions, scientifiques et autres, que nous avons pu avoir ensembles au laboratoire ou lors des congrès. Merci donc à Lamia, Lise, Casina, Mathilde, Caroline, Edith, Chantal, Cindy, Jean-Charles, Christine, Marie-Claude, Yohann, Frédéric, Cyril, Elodie, Adrien M., Alain, Françoise, Pauline, Jennifer, Adrien P., Charlène, Apoutou, Maxime, Anne-Gaëlle, Stéphane, Andrew et Aarash.

Un merci tout particulier à Olivier P. pour son humour et le temps passé à discuter, Olivier B. pour ses mots d'encouragement, Geoffrey et François pour leurs blagues très douteuses, Nathalie, Ismahène et Francesco pour leur aide et leurs conseils avisés. Je remercie tout particulièrement Isabelle pour sa gentillesse et son efficacité dans l'ensemble des tâches administratives.

I would like to thank Dr. Debashish Sahay, partner in crimes and bets for all the laughs, talks, dinners and trips that we shared together with Raphaël. Who could have said that you, looking like a teddybear, had so weird and funny ideas ? I won't forget your favorite sentence « I'm so smart, I'm eating at Rockfeller restaurant ! » and the (very cold) trip in New York ! These 3 years were amazing. I will cherish them. I wish you all the best for your future and hope to see you soon !

Merci à Laure et Anaïs d'avoir toujours été là pour moi, que ce soit à Lyon, à Paris, à Nîmes... ou à Marseille ! Merci à Didier et Bernadette pour leurs petits soins de Paris, Cécile et Rodolphe pour les (gros) repas lyonnais (ou savoyards), les discussions sur l'OL et leur soutien. Merci à Nathalie (Vamos Rafa !) et Henri El Diablo pour leur soutien et leurs encouragements, ils ont été précieux ! Et bien sûr, un immense merci à mes parents, qui m'ont permis de réaliser les études que je souhaitais sans trop comprendre de quoi il s'agissait ! Merci pour votre soutien, votre confiance et pour avoir eu le souci de m'apporter ce dont j'avais besoin (et même toujours plus !).

Enfin, et c'est sûrement par là que j'aurais dû débiter. Merci à « Kinicky ». Pour la version la plus débile de « With or Without You » jamais chantée dans un laboratoire, pour les 3 heures que cela t'a pris d'inverser mon bureau et ma paillasse (alors que mon coup des post-it était tellement plus réussi en 5 minutes !), pour tous les paris-muffins que tu as souvent perdu, les blagues foireuses (je dois avoir encore des cônes dans mon sac... !), les très nombreux débats (si Roger est une légende, Rafa en est une aussi ! Et Drive est un excellent film contrairement à Lawrence d'Arabie !), les fous rires partagés et les dialogues sur les étoiles dans le ciel, empruntés à Timon et Pumbaa ! Merci pour ton soutien, énorme depuis le début, ton aide, ta patience, ta franchise et ton regard malicieux sur tout ce que je fais. Je suis très fière de toi, Docteur. Personne ne pourra égaler ce que tu as fait et ce que tu fais pour moi chaque jour. Je me sens extrêmement chanceuse d'avoir pu partager cela avec toi et de t'avoir près de moi tous les jours.

Financements

Cette thèse a bénéficié d'un contrat doctoral de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS) obtenu en 2011.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été financés par l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du projet **MOTUS** (**M**étastases **O**sseuses **T**raitées par **U**ltrasons et un bisphosphonate), ANR-10-BLAN-1508 et par l'Institut Fédératif de Recherche 62.

Ces travaux ont également été financés par le LabEX DEVweCAN (ANR-10-LABX-61) de l'Université de Lyon au sein du programme « Investissements d'Avenir » (ANR-11-IDEX-0007) de l'Agence Nationale de la Recherche.

Résumé

Les métastases osseuses sont une complication majeure des cancers du sein. Elles sont responsables, sur le plan clinique, de complications particulières telles que : fractures, hypercalcémie et douleurs qui peuvent engager le pronostic vital ou aggraver rapidement la qualité de vie des patientes. Les bisphosphonates (BPs) font partie des traitements actuels car ils bloquent la progression des lyses osseuses en agissant sur les ostéoclastes mais sans agir sur la tumeur présente au sein de la cavité osseuse. Des effets anti-tumoraux ont été mis en évidence mais à des doses importantes, néphro-toxiques et de fait, incompatibles avec un usage clinique. La forte affinité des BPs pour le minéral osseux limite considérablement leur biodisponibilité et amoindrit donc leur potentiel antitumoral *in vivo*. Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre de la potentialisation des effets anti-tumoraux des BPs. Les BPs ont été combinés avec des ultrasons de faible intensité (LIUS) dont le rôle est d'induire une stimulation mécanique et une augmentation modérée de la température du milieu insonifié sans effet de cavitation. Dans un premier temps, les travaux ont montré que les LIUS favorisent la pénétration des BPs dans des cellules tumorales sans affecter leur viabilité. Les LIUS augmentent le phénomène d'endocytose et agissent notamment sur la voie des clathrines. Dans une seconde partie, les travaux ont démontré l'effet de cette combinaison *in vivo*, en utilisant un modèle murin de métastase osseuse, développé au laboratoire. Un traitement répété aux LIUS associé à une dose clinique de BPs entraîne une diminution des lyses osseuses ainsi que de la masse tumorale. L'accumulation d'un marqueur, la forme non-prénylée de Rap1A, retrouvée dans les moelles des souris traitées aux LIUS, suggère que la pénétration des BPs a été favorisée sous l'effet des LIUS. L'utilisation d'un BP fluorescent a permis un suivi de la répartition des BPs et montré que les LIUS favorisaient la libération des BPs hors de l'os. L'effet de l'association BPs avec les LIUS a ensuite été évalué sur un modèle de tumeur sous-cutanée mammaire. Un ralentissement de la croissance tumorale lors des premiers jours de traitements a été mis en évidence, supporté par une diminution de la prolifération et de l'angiogenèse des cellules tumorales. Une étude menée avec de la doxorubicine et des BPs a permis d'élargir le champ d'application des LIUS pour le traitement du cancer du sein. En conclusion, ces travaux montrent que les LIUS apparaissent comme une solution d'intérêt pour augmenter la pénétration de drogues dans des tumeurs osseuses et mammaires et augmenter leur potentiel antitumoral.

Mots clefs : bisphosphonates, ultrasons, métastases osseuses, cancer du sein, endocytose

Abstract

Treatment of bone metastases with a bisphosphonate and low intensity ultrasound

Bone metastases are common complications of advanced breast cancer. In a clinical approach, they induce fractures, hypercalcemia and pain that are life threatening. They also increase morbidity of patients and alter their quality of life. Among available treatments, bisphosphonates (BPs) stop the progression of osteolysis by acting on osteoclasts. However, BPs do not affect the tumor burden located inside the bone marrow cavity. Antitumoral effects have already been shown but with high doses incompatibles with a clinical use because of their nephrotoxicity. BPs bind also avidly to bone mineral which limits their bioavailability and reduce their antitumoral potential *in vivo*. This work is incorporated within the framework of the enhancement of antitumoral effects of BPs. BPs were combined with low intensity ultrasound (LIUS), which are known to induce a mechanical stimulation as well as a slight increase of temperature without involving cavitationnal effect. Initially, LIUS were found to increase the penetration of BPs inside several mammary tumor cell lines without affecting their viability. Clathrin-mediated endocytosis was found to be one pathway involved in that process. Then, using a breast cancer bone metastases mouse model, the effect of the association between LIUS and BPs was evaluated. A daily repeated treatment of LIUS associated with a single and clinical dose of BPs lead to a decrease in osteolysis as well as tumor burden. The accumulation of unphosphorylated Rap1A form was found in bone marrow of mice that received this combined treatment suggesting that LIUS promote BPs penetration inside cells of the bone cavity. The experiment was repeated using a fluorescent BP that enable us to follow the repartition of BPs fixed to bones after US treatment. LIUS trigger the release of BPs from the bone into the bloodstream. Based on that result, the effect of BPs and LIUS was evaluated in a subcutaneous mammary tumor xenograft. Tumor growth was slowed during the first days of LIUS treatment. Angiogenesis and tumor cell proliferation were found to be decreased to support this data. Tumor growth was then stronger. Finally, a study was performed using doxorubicin and BPs leading to a better penetration of both compounds when LIUS were used. This last result allows increasing the field of application of LIUS for breast cancer treatment. In conclusion, this work showed that LIUS are an interesting method to enhance the penetration of drugs inside bone and mammary tumors leading to an increase of their antitumoral activity.

Keywords: bisphosphonates, ultrasound, bone metastases, breast cancer, endocytosis

Sommaire

Remerciements	3
Financements	6
Résumé	7
Abstract	8
Sommaire	9
Table des illustrations	14
Liste des tableaux	16
Liste des abréviations	17
CHAPITRE 1	20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	20
I) LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE	20
A. Structure de l'os et vascularisation	20
B. Composition du tissu osseux	21
1. Les cellules osseuses	21
2. La matrice osseuse.....	25
C. Le remodelage osseux	26
1. Phase d'activation.....	26
2. Phase de résorption.....	26
3. Phase d'inversion.....	27
4. Phase de formation.....	27
5. Phase de quiescence	28
II) LE CANCER DU SEIN METASTATIQUE A L'OS.....	28
A. Stratégies thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein.....	28
1. La classification des cancers du sein	28
2. Pronostics et traitements	29
B. Développement d'une métastase osseuse.....	30
1. L'échappement des cellules tumorales vers l'os	30
2. Les métastases osseuses ostéolytiques	31
C. Symptômes cliniques des métastases osseuses.....	33
D. Traitement des métastases osseuses	34
1. Traitements locaux	34
2. Traitements systémiques.....	35

III) LES BISPHOSPHONATES	35
A. Structure et activité des BP.....	36
B. Distribution cellulaire et tissulaire des BP.....	37
C. Internalisation cellulaire des BP.....	38
D. Cibles moléculaires des BP.....	39
E. Le ZOL dans le traitement des métastases osseuses	42
F. Activité antitumorale des BP.....	43
1. Action directe des BP	43
2. Activité anti-angiogénique des BP.....	44
3. Relation des BP avec les lymphocytes T $V\gamma9\gamma\delta2$	45
G. Le ZOL en situation adjuvante.....	46
IV) LES ULTRASONS	47
A. Généralités.....	47
1. L'effet piézoélectrique.....	47
2. Propagation d'une onde ultrasonore.....	47
B. Effets biologiques des US.....	48
1. Effets thermiques.....	48
2. Phénomènes de cavitation	51
3. Effets mécaniques	52
C. Les US thérapeutiques	52
D. Stimulation osseuse par US.....	53
1. Ondes de choc.....	53
2. LIPUS	54
E. Délivrance de drogues par US	56
V) OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	59
CHAPITRE 2	61
INSTRUMENTATION ULTRASONORE POUR LA DELIVRANCE DE	
BISPHOSPHONATES <i>IN VITRO</i> PAR ULTRASONS.....	61
I) INTRODUCTION	61
II) MATERIEL ET METHODES	61
A. Sondes ultrasonores.....	61
B. Paramètres ultrasonores.....	63
C. Matériel ultrasonore.....	63
D. Mesures des performances acoustiques	64

E.	Mesure de la température induite <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> par les ultrasons.....	65
F.	Mesures de cavitation.....	67
III)	MATERIEL ET METHODES	67
A.	Lignées cellulaires.....	67
B.	Bisphosphonate	68
C.	Synopsis.....	68
D.	Traitements ultrasonores	69
E.	Traitements hyperthermiques	69
F.	Prolifération des cellules.....	70
G.	Viabilité des cellules.....	70
H.	Extraction et dosage de l'IPP et de l'Apppl.....	70
I.	Western Blot	71
J.	Microscopie électronique à transmission.....	71
1.	Ultrastructure	71
2.	Immunomarquage	72
K.	Test statistique	72
IV)	RESULTATS.....	73
A.	Calibration des sondes ultrasonores.....	73
B.	Mesures de température et cavitation	73
C.	Influence de la puissance acoustique sur la pénétration de ZOL.....	75
D.	Pénétration du ZOL avec des US de faible intensité	77
E.	Pénétration du ZOL par endocytose induite par US.....	80
F.	Application au modèle tumoral MDA-MB-231/B02	83
V)	CONCLUSION.....	84
CHAPITRE 3		87
POTENTIALISATION <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET ANTI-TUMORAL D'UN		
BISPHOSPHONATE PAR ULTRASONS DE FAIBLE INTENSITE.....		87
I)	CONTEXTE CLINIQUE ET HYPOTHESE	87
II)	MATERIEL ET METHODES	87
A.	Modèle de xénogreffe MDA-MB-231/B02	87
B.	Protocole animal en situation de métastase osseuse	88
1.	Synopsis	88
2.	Histologie	91
3.	Western Blot	92
4.	Analyse statistique	92

C.	Utilisation d'un bisphosphonate fluorescent.....	92
1.	Synopsis	92
2.	Prélèvements et histologie.....	93
3.	Analyse des résultats	93
4.	Test statistique	94
D.	Protocole de tumorigenèse.....	94
1.	Synopsis	94
2.	Prélèvements et immunohistochimie.....	94
3.	Test statistique	95
III)	RESULTATS.....	95
A.	Tolérance des traitements.....	95
B.	Evaluation des lyses osseuses.....	96
C.	Mesure de la masse tumorale et du volume osseux	99
D.	Effets sur l'activation des ostéoclastes.....	100
E.	Prolifération des cellules tumorales et angiogenèse.....	102
F.	Evaluation de la forme non prénylée de Rap1A dans la cavité médullaire.....	103
G.	Mesure de la quantité de BP liée à l'os	104
H.	Effets des C-US dans l'évolution de tumeurs sous-cutanées.....	106
IV)	CONCLUSION	108
CHAPITRE 4	111
UTILISATION DES ULTRASONS DE FAIBLE INTENSITE DANS UN MODELE TUMORAL MAMMAIRE EN SITUATION NEO-ADJUVANTE	111
I)	CONTEXTE CLINIQUE.....	111
II)	MATERIEL ET METHODES.....	112
A.	Lignée cellulaire	112
B.	La doxorubicine	112
C.	Traitements <i>in vitro</i>	113
D.	Viabilité cellulaire	114
E.	Protocole animal.....	114
1.	Modèle orthotopique de tumeur mammaire	114
2.	Synopsis	115
3.	Histologie	116
4.	Test statistique	116
III)	RESULTATS.....	117
A.	Etude in vitro	117

1. Détermination de la concentration en Dox.....	117
2. Effets du ZOL sur la viabilité des 4T1.....	117
3. Traitements combinés.....	118
B. Etude in vivo	119
1. Tolérance des traitements.....	119
2. Evolution du volume tumoral	120
3. Poids des tumeurs primaires.....	122
4. Immunohistochimie	123
IV) CONCLUSION.....	124
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	126
I) CONCLUSIONS EXPERIMENTALES	126
A. Potentialisation de l'effet antitumoral des BPs par C-US.....	126
B. Les C-US en situation néo-adjuvante.....	128
C. Mécanismes d'action des US.....	129
II) PERSPECTIVES EXPERIMENTALES	131
A. Etudes des effets mécaniques induits	131
B. Nanotechnologies.....	131
C. Effets des US sur l'environnement osseux.....	132
D. Paramètres des LIPUS.....	133
E. Applications à d'autres cancers	134
III) PERSPECTIVES CLINIQUES.....	134
ANNEXES.....	136
I) Effet des LIPUS sur un modèle de métastases osseuses et de tumeur sous-cutanée .	136
II) Effets des LIPUS en situation néo-adjuvante	143
PUBLICATIONS ET.....	147
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	147
I) Liste des publications.....	147
II) Liste des communications scientifiques	147
A. Communications lors de congrès internationaux.....	147
B. Communications lors de congrès nationaux et journées scientifiques	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'un os long	21
Figure 2 : Différenciation des ostéoblastes	22
Figure 3 : Différenciation des ostéoclastes	24
Figure 4 : Résorption de la matrice osseuse par un ostéoclaste	25
Figure 5 : Le remodelage osseux	27
Figure 6 : Métastases osseuses ostéolytiques	31
Figure 7 : Le cercle vicieux des métastases osseuses	33
Figure 8 : Structure du PPI et des BPs	36
Figure 9 : Structure chimique du ZOL	37
Figure 10 : Internalisation de l'alendronate fluorescent dans des ostéoclastes	39
Figure 11 : La voie du mévalonate et son inhibition par les N-BPs	41
Figure 12 : Synthèse de l'Apppl	42
Figure 13 : Contraction et dilatation d'un transducteur	48
Figure 14 : Dommages d'une hyperthermie sur les tissus en fonction du temps	51
Figure 15 : Délivrance de drogue par cavitation	59
Figure 16 : Sonde ultrasonore	62
Figure 17 : Mesure du rendement et de la puissance acoustique	65
Figure 18 : Mesure de la température <i>in vivo</i>	66
Figure 19 : Traitement ultrasonore <i>in vitro</i>	67
Figure 20 : Synopsis des traitements <i>in vitro</i>	69
Figure 21 : Mesures de rendements et de puissances des deux sondes ultrasonores	73
Figure 22 : Evolution de la température et évaluation de la cavitation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	74
Figure 23 : Influence de la puissance acoustique sur la pénétration de ZOL	76
Figure 24 : Effets des US sur la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales	79
Figure 25 : Comptage des vésicules d'endocytose après un traitement C-US et LIPUS	80
Figure 26 : Marquage des clathrines après un traitement C-US, LIPUS ou HT	82
Figure 27 : Effets des C-US sur la pénétration du ZOL dans la lignée MDA-MB-231/B0284	89
Figure 28 : Synopsis du protocole animal mimant une situation de métastases osseuse	89
Figure 29 : Traitement ultrasonore <i>in vivo</i>	90
Figure 30 : Synopsis du protocole avec le BP fluorescent	93
Figure 31 : Evolution du poids des animaux au cours du protocole de métastases osseuses	96
Figure 32 : Evolution des lyses osseuses par radiographie sous l'effet de C-US et de ZOL	98

Figure 33 : Evaluation de la masse tumorale au sein de la cavité osseuse.....	100
Figure 34 : Mesure de l'activité ostéoclastique	101
Figure 35 : Angiogenèse et prolifération tumorale après un traitement au ZOL + C-US..	103
Figure 36 : Western Blot dans les extraits de moelle osseuse.....	104
Figure 37 : Quantification du FAM-RIS lié à l'os après un traitement C-US	105
Figure 38 : Effet des C-US associés au ZOL sur des tumeurs sous-cutanées	107
Figure 39 : Poids des tumeurs sous-cutanées après un traitement au ZOL + C-US	108
Figure 40 : Structure chimique de la doxorubicine	112
Figure 41 : Synopsis du protocole associant Dox, ZOL et C-US.....	115
Figure 42 : Pénétration du 7-AAD dans des cellules 4T1 selon la concentration en Dox..	117
Figure 43 : Viabilité de cellules 4T1 traitées au ZOL	118
Figure 44 : Effets des US, de la Dox et du ZOL sur la viabilité cellulaire des 4T1	119
Figure 45 : Evolution du poids des animaux pour les différents groupes de traitement.....	120
Figure 46 : Mesure des volumes tumoraux entre J7 et J15.....	121
Figure 47 : Poids de la tumeur primaire mammaire 4T1.....	123
Figure 48 : Immunohistochimie réalisée sur la tumeur primaire mammaire 4T1	124
Figure 49 : Evaluation des lyses osseuses avec un traitement LIPUS	137
Figure 50 : Activité ostéoclastique suite à un traitement LIPUS.....	138
Figure 51 : Effets des LIPUS sur la masse tumorale	139
Figure 52 : Angiogenèse et prolifération tumorale	140
Figure 53 : Quantification du BP fluorescent lié à l'os après un traitement LIPUS	141
Figure 54 : Evolution d'une tumeur sous-cutanée traitée par LIPUS et ZOL	142
Figure 55 : Tumeurs 4T1 traitées avec de la Dox, du ZOL et des LIPUS.....	144
Figure 56 : Poids de la tumeur primaire mammaire suite à un traitement LIPUS	145
Figure 57 : Immunohistochimie des tumeurs 4T1 après un traitement LIPUS	146

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et traitements du cancer du sein	29
Tableau 2 : Exemples de valeurs du coefficient d'atténuation (a) de tissus biologiques et de leur coefficient de non linéarité (b)	49
Tableau 3 : Groupes de traitements et effets évalués.	89
Tableau 4 : Groupes de traitement dans le protocole Dox, ZOL et C-US.....	116
Tableau 5 : Evolution des volumes tumoraux entre J7 et J15.....	122

Liste des abréviations

7-AAD	7-amino-actinomycine D
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Akt	Protein kinase B
AMP	Adenosine Monophosphate
ANT	Adenine Nucleotide Translocase
ApppI	Triphosphoric acid 1-adenosin-5'-yl ester 3-(3-methylbut-3-enyl) ester
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basal Multi Cellular Unit
BP_s	Bisphosphonates
CASR	Calcium-sensing Receptor
CFU-GM	Granulocytes macrophage colony forming unit
Cox-2	Cyclooxygenase-2
CSF1R	Colony-Stimulating Factor 1 Receptor
C-US	Ultrasons continus de faible intensité – Low Intensity Continuous Ultrasound
Da	Dalton
Dkk-1	Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 1
DMAPP	Dimethylallyl pyrophosphate
Dox	Doxorubicine
ER	Estrogen Receptor
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAM-RIS	Risédrone fluorescent
FGF	Fibroblast Growth Factor
FPP	Farnesyl pyrophosphate
FPPS	Farnesyl pyrophosphate synthase
FTase	Farnesyl-transferase
GGTase	Geranylgeranyl-transferase
GPP	Geranylgeranyl pyrophosphate
HAP	Hydroxyapatite
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HIFU	High-Intensity Focused Ultrasound
HSP	Heat Shock Protein
HT	Hyperthermie
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Hz	Hertz
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IGF-1	Insulin Like Growth Factor-1
IL	Interleukine
IPP	Isopentenyl Pyrophosphate
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LOV	Lovastatine
LIPUS	Ultrasons pulsés de faible intensité – Low Intensity Pulsed Ultrasound
LIUS	Ultrasons de faible intensité – Low Intensity Ultrasound
LPA	Acide Lysophosphatidique
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MMP	Métalloprotéase
MSCs	Mesenchymal stem cell
N-BP	Amino-bisphosphonate
NF-κB	Nuclear Factor kappa-B
NO	Oxide nitrique
Non N-BP	Non amino-bisphosphonate
OPG	Ostéoprotégérine
Pa	Pascal
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PGE₂	Prostaglandine E ₂
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPi	Pyrophosphate inorganique
PR	Progesterone Receptor
P/S	Pénicilline/Streptomycine
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTHrP	Parathyroid Hormone-related Protein

RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Runx2	Runt-related Transcription Factor 2
SATA	Spatial-average temporal-average
SVF	Sérum de veau foetal
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAP	Tartrate –resistant Acid Phosphatase
US	Ultrasons
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
ZOL	Zolédronate/ acide zolédronique

CHAPITRE 1

Introduction bibliographique

I) LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE

L'os est un tissu conjonctif solidifié qui forme, avec le cartilage, le squelette. Le tissu osseux assure trois fonctions majeures au sein de l'organisme : il supporte les structures corporelles, protège les organes internes (notamment le cerveau, le cœur et les poumons) et facilite le mouvement du corps en servant d'attaches aux muscles. Il possède en outre une fonction hématopoïétique (1) et une fonction métabolique puisqu'il est capable de stocker le calcium et le phosphate. C'est un tissu complexe en perpétuel renouvellement. Sa structure et sa composition influencent largement le devenir de cellules cancéreuses métastatiques.

A. Structure de l'os et vascularisation

Il existe trois types d'os : les os longs comme les fémurs et les tibias ; les os courts (vertèbres, phalanges et tarses) et les os plats (crâne, omoplates). Un os long se compose d'une partie centrale cylindrique, la diaphyse, et de deux extrémités, les épiphyses. La diaphyse et l'épiphyse sont reliées par une zone de croissance appelée la métaphyse. La diaphyse est constituée d'un tissu compact appelé tissu cortical. Elle est creusée du canal médullaire rempli de moelle osseuse jaune assurant le stockage de graisses, et de moelle osseuse rouge pour le stockage de cellules hématopoïétiques. La diaphyse est entourée d'une membrane appelée le périoste. Ce dernier est riche en vaisseaux nourriciers qui participent à l'ossification en profondeur. Le long de la cavité centrale est bordé par l'endoste contenant les cellules ostéoprogénitrices. Les épiphyses sont composées de tissu spongieux, poreux et de faible résistance mécanique. Elles sont recouvertes de cartilage articulaire (**Figure 1**).

L'os est un tissu richement innervé. De nombreuses fibres, myélinisées ou non, se situent dans le périoste. C'est un tissu également fortement vascularisé. Dans les os longs, les artères entrent par la partie médiane de la diaphyse. Des artères métaphysaires et épiphysaires pénètrent par les extrémités de l'os. Le retour veineux s'effectue par des voies parallèles. La forte vascularisation de l'os et la répartition des vaisseaux sanguins expliquent en partie la propension des cellules métastatiques à disséminer dans la moelle osseuse (2). La colonisation de l'os par les cellules tumorales débute ainsi à l'extrémité des artères principales et se déroule le long des artères parcourant l'os (2). La structure et la

vascularisation de l'os en font ainsi un site métastatique privilégié pour les tumeurs du sein, du poumon et de la prostate.

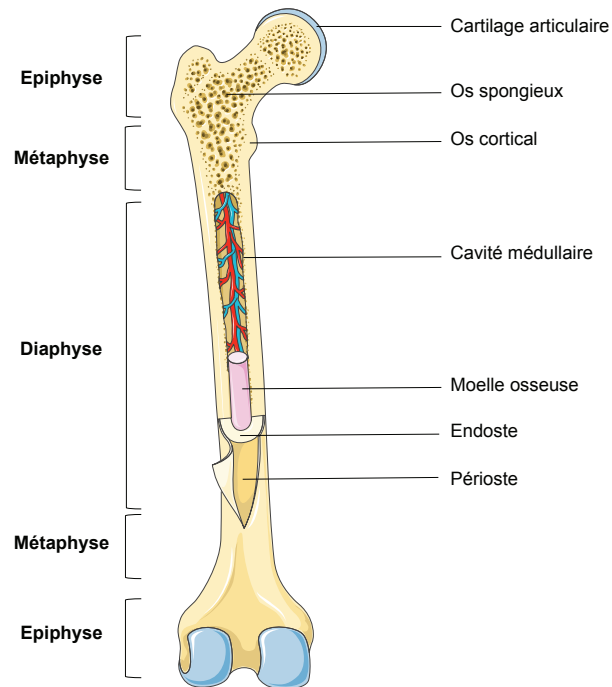


Figure 1 : Structure d'un os long

Un os long se compose de 3 parties : l'épiphyse, aux extrémités, la diaphyse, qui constitue la partie centrale et enfin la métaphyse qui assure la jonction entre l'épiphyse et la diaphyse. La cavité médullaire est remplie de moelle osseuse jaune et rouge. L'os est également un tissu innervé et fortement vascularisé.

B. Composition du tissu osseux

Le tissu osseux se compose de matrice extracellulaire et de cellules osseuses spécifiques. Les fonctions de ces dernières sont directement reliées à divers phénomènes comme le remodelage osseux permanent, la réparation de l'os après une fracture et enfin, à l'évolution des métastases osseuses.

1. Les cellules osseuses

Le tissu osseux se compose de 4 types cellulaires : les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes qui sont des cellules ostéoformatrices ; et les ostéoclastes qui sont les seules cellules capables de résorber l'os.

Les ostéoblastes

Les ostéoblastes synthétisent et minéralisent la matrice osseuse au cours de la croissance, du renouvellement et de la réparation osseuse. Ils mesurent entre 20 et 30 μm de diamètre. Un ostéoblaste actif est une cellule cuboïde, mononucléée et polarisée (3).

L'ostéogénèse est caractérisée par l'engagement et la prolifération des cellules ostéoprogénitrices qui se différencient ensuite en ostéoblastes fonctionnels chargés de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les pré-ostéoblastes dérivent de cellules souches de la lignée mésenchymateuse (4). La différenciation vers l'ostéoblaste mature se fait en plusieurs étapes et résulte de l'expression de gènes précoces ou de facteurs locaux contrôlant directement ou indirectement l'ostéogénèse. Cbfa1/Runx2 est ainsi un facteur de transcription indispensable à l'engagement d'une cellule souche pluripotente dans la voie de différenciation des ostéoblastes (**Figure 2**). Runx2 régule également l'expression d'un autre facteur de transcription, Osterix, qui permet la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes immatures. Cette étape de différenciation dépend de plusieurs facteurs comme la N-cadhérine qui induit l'expression de gènes de différenciation dont Cbfa1/Runx2 dans les ostéoblastes (5). Enfin, des facteurs systémiques, tels l'hormone parathyroïdienne, les estrogènes ou encore la vitamine D, et locaux (cytokines et facteurs de croissance comme IGF-1 et TGF- β) (6) peuvent influencer l'ostéoblastogénèse (**Figure 2**).

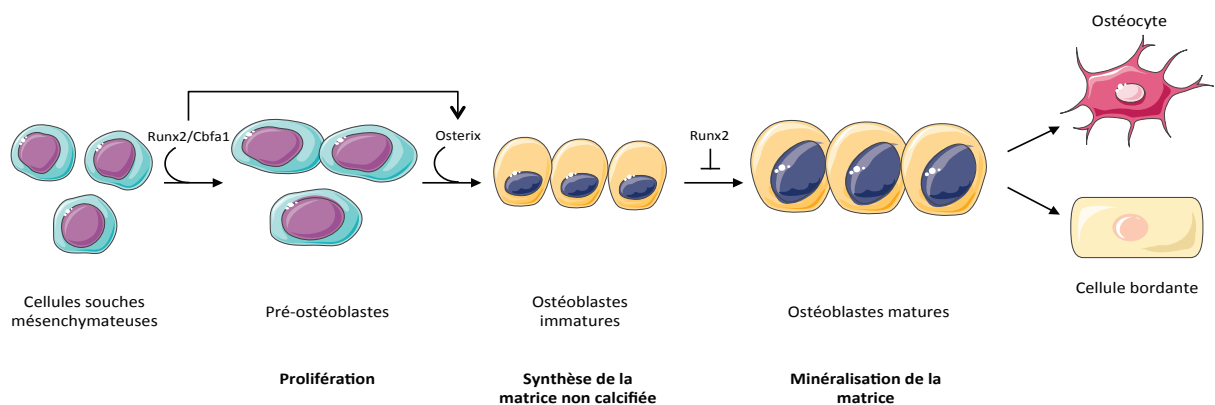


Figure 2 : Différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes expriment de façon séquentielle, au cours de la différenciation, plusieurs marqueurs. La différenciation progressive de l'ostéoblaste est caractérisée par l'expression de gènes codant pour l'hormone parathyroïdienne (PTH), la phosphatase alcaline, le collagène de type I, l'ostéopontine ou plus tard, pour l'ostéocalcine.

Le devenir des ostéoblastes peut être la mort par apoptose dans 65% des cas, la mise au repos sous forme de cellules bordantes qui tapissent les surfaces osseuses ou la transformation en ostéocytes.

Les ostéocytes et les cellules bordantes

Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os. Ce sont des cellules fusiformes et différenciées, piégées dans la matrice osseuse minéralisée. Ils contribuent à l'homéostasie calcique et au maintien de la matrice osseuse. Les cellules bordantes sont des ostéoblastes au repos. Ce sont des cellules aplaties et allongées, capables de redevenir des ostéoblastes actifs si elles sont sollicitées (7). Elles assurent la communication entre la surface osseuse qu'elles tapissent, l'environnement cellulaire et les ostéocytes piégés dans la matrice osseuse.

Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules géantes (entre 50 et 100 μm de diamètre), plurinucléées et polarisées. Leur noyau est situé à l'opposé de la surface osseuse. Ils sont d'origine hématopoïétique. Ce sont les seules cellules responsables de la résorption osseuse. L'ostéoclastogenèse est initiée et contrôlée par des facteurs synthétisés par les ostéoblastes et les cellules stromales mais également par des interactions directes avec ces cellules. Les ostéoblastes produisent trois facteurs essentiels aux processus de différenciation : le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), le RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand) et l'OPG (Ostéoprotégérine) (**Figure 3**). Le M-CSF se lie à son récepteur CSF1R/cfms (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) et permet alors l'engagement des précurseurs dans une voie macrophage/monocyte en stimulant leur prolifération et leur survie. Il induit également la production du récepteur RANK à la surface des ostéoclastes. RANK-L est le ligand de RANK. Il est synthétisé dans l'os par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire et par les ostéoblastes. La fixation de RANK-L à son récepteur RANK permet la différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures. L'OPG est un inhibiteur naturel du RANK-L. C'est un récepteur leurre qui se lie à RANK-L et empêche ainsi son action. L'OPG et RANK-L ont donc des effets inverses sur l'ostéoclastogenèse. C'est le rapport de sécrétion OPG/RANK-L par les ostéoblastes qui constitue le contrôle essentiel du processus de la résorption osseuse et qui détermine le devenir des ostéoclastes (8, 9). Des hormones et facteurs locaux peuvent agir sur le système RANK-L, RANK et OPG. C'est le cas de la PTH et de la vitamine D. Certaines cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- α) peuvent stimuler la synthèse de M-CSF et de RANK-L par

les précurseurs ostéoblastiques médullaires, ce qui renforce le nombre et l'activité des ostéoclastes. L'expression de RANK-L est également stimulée par des cytokines (IL-6) et par des hormones dont les estrogènes (10).

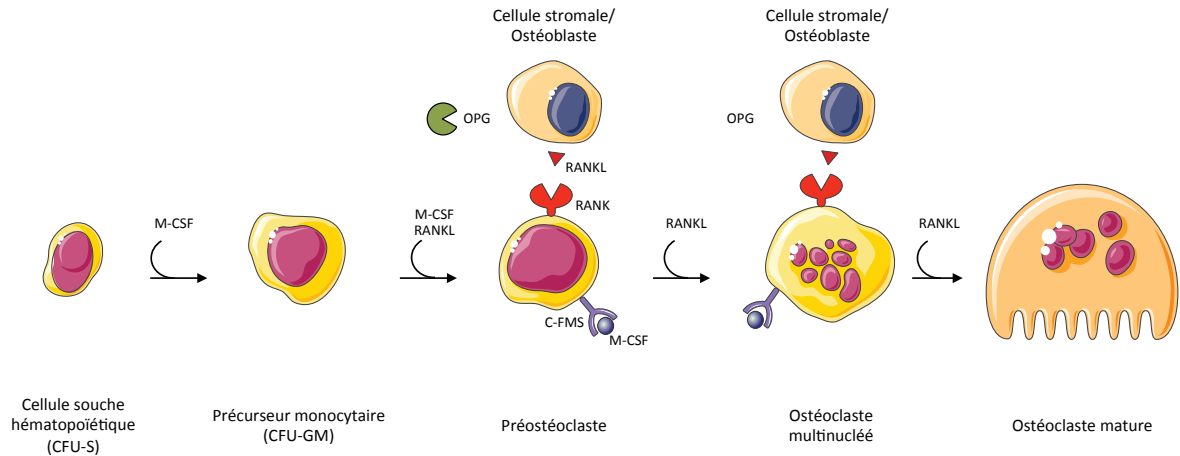


Figure 3 : Différenciation des ostéoclastes

L'ostéoclast fonctionne de manière cyclique et alterne entre des phases migratoires le long de la surface osseuse et des phases de résorption osseuse formant ainsi des lacunes osseuses. La polarité de l'ostéoclaste est essentielle à son fonctionnement : le pôle apical comprend la zone d'attachement et délivre des enzymes lysosomales (TRAP, cathepsine K) et des métalloprotéases (MMP-9) qui dégradent la matrice (11). L'activation de TRAP par clivage en TRAP 5b conduit à la production de dérivés oxygénés qui terminent de détruire la matrice. Des pompes à protons permettent la sécrétion d'ions H^+ et Cl^- qui acidifient le compartiment de résorption osseuse, permettant ainsi un fonctionnement optimal des enzymes lysosomiales. Le pôle baso-latéral est en rapport avec l'environnement osseux et demeure essentiel pour le maintien de l'équilibre électrochimique de l'ostéoclaste (**Figure 4**).

Au cours de la résorption osseuse, l'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse. Cette motilité est régie par l'organisation du cytosquelette d'actine et par la distribution de podosomes. L'ostéoclaste se fixe ainsi à la matrice osseuse *via* l'interaction de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et forme une zone scellée, la lacune de Howship, dans laquelle le processus de résorption a lieu (**Figure 4**). Après un nombre probablement déterminé de cycle de phases migratoires et de phases de résorption, l'ostéoclaste entre dans une phase d'apoptose.

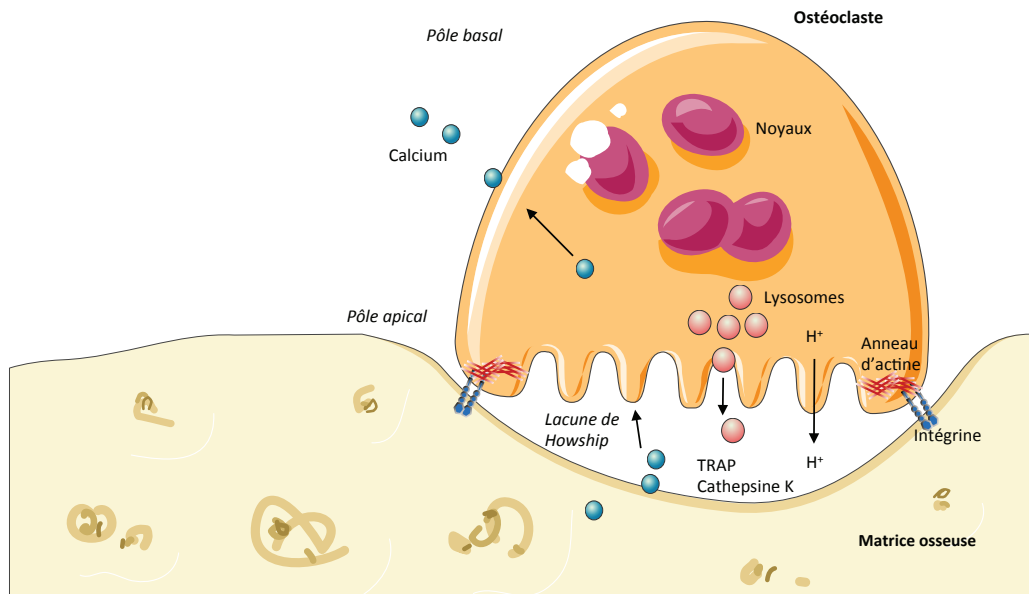


Figure 4 : Résorption de la matrice osseuse par un ostéoclaste

Le processus de résorption a lieu dans la lacune de Howship qui constitue une zone entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse. Cette fixation à la matrice osseuse par les ostéoclastes est possible grâce à l'intégrine $\alpha v \beta 3$. La dégradation de la matrice osseuse est réalisée par le relargage dans cette lacune d'enzymes telles la cathepsine K et l'enzyme TRAP.

2. La matrice osseuse

La matrice osseuse est divisée en matrice organique (25%) et inorganique ou minérale (65%). L'eau représente environ 10% de la matrice. Sa teneur varie en fonction de l'âge et du degré de minéralisation. L'ostéoblaste synthétise la matrice osseuse et régule ensuite sa minéralisation.

La matrice organique

La matrice organique se compose de 90% de collagène de type I. Le collagène forme un réseau fibreux et confère à l'os sa résistance et son élasticité. Des protéines non collagéniques sont associées à ce réseau et contribuent à la minéralisation osseuse. Parmi elles, l'ostéonectine fournit des sites permettant l'ancrage de cristaux d'hydroxyapatite (HAP) à la matrice, ce qui permet la fixation des ostéoblastes. L'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et la fibronectine favorisent la maturation des ostéoblastes et l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse. Enfin, l'ostéocalcine favorise la fixation du calcium à la matrice osseuse. Sa concentration dans le sang est utilisée en clinique comme un indice de formation osseuse (12).

La matrice inorganique

La matrice organique constitue la première réserve en minéraux de l'organisme. Elle contient 99% du calcium, 85% du phosphore et entre 40-60% du magnésium et du sodium. Deux phases constituent la minéralisation du tissu osseux : la première phase est dite de sécrétion pendant laquelle les fibres de collagène s'orientent en fonction des tractions de l'ostéoblaste sur la matrice ; et une deuxième phase dite de minéralisation au cours de laquelle des ions calcium et phosphate forment des cristaux d'HAP de formule chimique $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Ces cristaux se fixent à la fois entre et sur les fibres de collagène et assurent ainsi la minéralisation de l'ostéoïde. La formation de cristaux implique l'intervention de l'ostéocalcine, qui capte des ions Ca^{2+} , et des ostéoblastes qui génèrent des vésicules riches en phosphatases alcalines provoquant l'accumulation d'ions Ca^{2+} et PO_4^{4-} .

C. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique en constant renouvellement. Le remodelage osseux a plusieurs visées : il permet la substitution d'un os primaire infantile en os adulte, il conserve les propriétés mécaniques ou d'adaptation aux contraintes et participe au maintien de l'homéostasie calcique. Des anomalies du remodelage osseux peuvent conduire à des pathologies telles la maladie de Paget, l'ostéoporose ou l'hyperparathyroïdie (13).

Le BMU (Basal Multicellular Unit) est le nom donné à une unité fonctionnelle de remodelage (14). Au sein de cette unité, les ostéoblastes et les ostéoclastes agissent de manière séquentielle et complémentaire (15). Le résultat de cette unité est appelé un ostéon. Le processus de remodelage osseux se compose de cinq étapes (14, 15) (**Figure 5**).

1. Phase d'activation

Le remodelage osseux débute par la détection de signaux mécaniques (fractures, prise de poids par exemple), hormonaux (estrogènes, PTH) ou nerveux (16) par les ostéocytes (17) qui sécrètent de façon basale du TGF- β , un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse. Les dommages faits à la matrice entraînent l'apoptose des ostéocytes et de fait, une diminution des taux de TGF- β ce qui initie l'ostéoclastogénèse (18). Les cellules bordantes se rétractent également, permettant l'adhésion des ostéoclastes à la matrice osseuse.

2. Phase de résorption

Les ostéoblastes sont impliqués dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes actifs *via* la production d'IL-6, IL-11, le MCS-F et le RANK-L. Une fois ancré à

la matrice osseuse, l'ostéoclaste peut alors déverser des enzymes protéolytiques qui détruisent la matrice organique, libérant ainsi des produits de dégradation du collagène dont le dosage peut être utilisé en clinique afin d'évaluer la résorption osseuse.

3. Phase d'inversion

La phase d'inversion correspond au détachement des ostéoclastes et leur apoptose. Des cellules d'inversion, appelées « ostéoMacs » et issues de la lignée macrophagique apparaissent et éliminent les débris de la matrice (19). La résorption osseuse a permis la libération de facteurs de croissance (IGFs, FGFs, BMPs) qui vont activer la différenciation des ostéoblastes (20). Ces derniers produisent de l'OPG qui inhibe la différenciation ostéoclastique.

4. Phase de formation

La différenciation des ostéoblastes commence et les ostéoblastes matures synthétisent et déposent une nouvelle matrice, l'ostéoïde, comblant ainsi la lacune de résorption préalablement formée par les ostéoclastes. La production osseuse est stimulée par plusieurs hormones notamment les estrogènes et la vitamine D. La matrice se minéralise à la jonction entre le tissu ostéoïde et le tissu minéralisé environ 15 jours après.

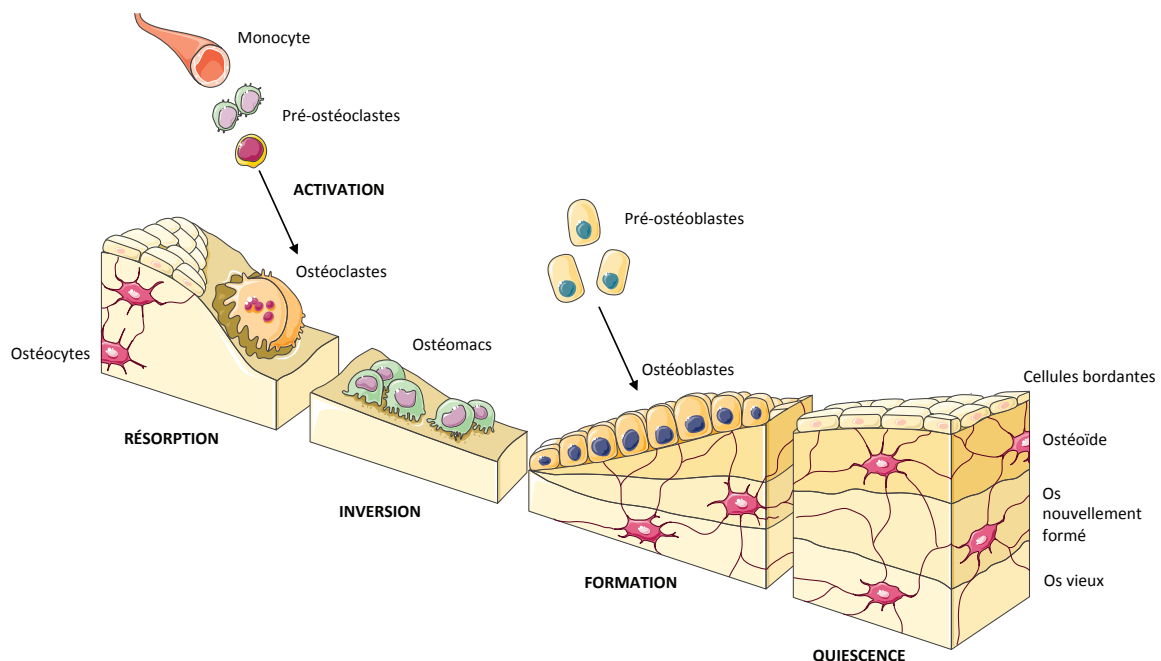


Figure 5 : Le remodelage osseux

Le remodelage osseux est constitué de 5 étapes : une phase d'activation des ostéoclastes, les cellules qui résorbent l'os. La phase de résorption peut alors commencer. Une phase d'inversion commence ensuite, faisant intervenir les ostéomacs qui éliminent les débris de la matrice. Les ostéoblastes initient alors la phase de formation osseuse. Enfin, une phase de quiescence se met en place.

5. Phase de quiescence

La majorité des ostéoblastes meurt ensuite par apoptose. Certains vont se mettre au repos sous forme de cellules bordantes, d'autres vont se transformer en ostéocytes.

II) LE CANCER DU SEIN METASTATIQUE A L'OS

En France, chez la femme, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent. En 2012, près de 49000 nouveaux cas ont été recensés. Le nombre de décès est évalué à 12000 (21). La biopsie demeure un examen de référence à la découverte d'une tumeur mammaire. Les résultats obtenus permettent de classer la tumeur selon son grade histologique et de choisir une stratégie thérapeutique adaptée.

A. Stratégies thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein

Une tumeur mammaire se caractérise par une signature moléculaire qui lui est propre. La connaissance de cette signature permet de dégager les caractéristiques biologiques de la tumeur, de prédire son évolution clinique et sa réponse aux traitements (22). Afin de mieux comprendre les stratégies thérapeutiques dans le traitement du cancer du sein, il convient ainsi de connaître les différents types de cancer du sein.

1. La classification des cancers du sein

La localisation restreinte des cellules cancéreuses à l'intérieur des canaux ou des lobules du sein désigne un carcinome canalaire *in situ*. Il a été estimé qu'environ 80% des cas de cancers *in situ* étaient des cancers canaux. En revanche, lorsque les cellules cancéreuses ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules, on parle de carcinome infiltrant. Enfin, il existe des formes rares de carcinomes infiltrants dont le carcinome médullaire, touchant davantage les femmes jeunes, les carcinomes mucineux, tubulaires ou papillaires. Cette dernière forme peut être également recensée parmi les cancers *in situ*.

La classification des cancers mammaires repose sur la recherche par immunohistochimie de récepteurs aux estrogènes (ER), à la progestérone (PR), de la surexpression de l'oncoprotéine HER2 (HER : human epidermal growth factor receptor-2) et enfin de cytokératines 5/6. Ainsi, l'expression des récepteurs aux estrogènes (ER+) est fréquemment associée à l'expression des récepteurs à la progestérone (PR+) et définit un premier groupe de cancers dit « luminaux ». On distingue deux sous-groupes parmi ces tumeurs : celles qui ne sur-expriment pas HER2 constituent le sous-groupe A ; celles qui sur-expriment HER2

forment le sous-groupe B. Lorsque les récepteurs hormonaux ne sont pas exprimés (ER-, PR-), trois sous-groupes sont mis en évidence : le premier est appelé triple négatif (ER-, PR-, HER2-), le deuxième est dit HER2 positif (HER2+), enfin le troisième est dit « basal like » et n'exprime ni ER, ni PR ni HER2 mais fortement les cytokératines 5/6 et/ou le récepteur EGFR (EGFR : epidermal growth factor receptor). Enfin, il existe des formes non classifiées négatives pour chacun de ces 5 marqueurs (ER, PR, HER2, EGFR, cytokératine 5/6) (**Tableau 1**) (23).

Forme	Sous-type	Caractéristiques moléculaires	Traitement
Luminale	A	ER+, PR+, HER2-	Hormonothérapie
	B	ER+, PR+, HER2+	Hormonothérapie + chimiothérapie
HER2+		ER-, PR-, HER2+	Anti-HER2
Triple négative		ER-, PR-, HER2-	Sels de platine, anti-angiogéniques

Tableau 1 : Classification et traitements du cancer du sein

Pour chaque forme de carcinome mammaire, les caractéristiques moléculaires sont explicitées (ER : récepteur aux estrogènes ; PR : récepteur à la progestérone ; HER2 : oncoprotéine HER2) ainsi que les traitements de référence.

2. Pronostics et traitements

Le sous-type moléculaire influence fortement le pronostic et le traitement mis en place. Ce dernier peut être administré avant une chirurgie, afin de réduire la masse tumorale avant résection, ou après, dans le but de réduire le risque de dissémination métastatique. Les cancers dits « luminaux » présentent un bon pronostic et une survie d'environ 85%, 5 ans après le diagnostic (23). Ces deux types étant ER+ et PR+, le traitement de base repose sur une hormonothérapie (comme le tamoxifène) qui va soit modifier la sécrétion d'hormones ou bloquer l'action de ces dernières dans le but de stopper la prolifération tumorale. Cependant, le carcinome luminal B est associé à un pronostic plus réservé que le carcinome luminal A. Il demeure moins sensible à l'hormonothérapie que le type A mais plus à la chimiothérapie. Les cancers HER2+ sont associés à un taux de survie faible (50% à 5 ans). L'utilisation de thérapies ciblées à base de trastuzumab en association avec une chimiothérapie a cependant permis d'augmenter la survie des patientes. Les cancers de type « basal like » sont ER- et PR- mais également HER2- et sont de fait difficiles à traiter. Ils sont associés à un pronostic faible et présentent des réponses variables à la chimiothérapie. Ces formes de cancer sont par exemple sensibles aux sels de platine et aux anti-angiogéniques mais résistantes aux anthracyclines comme la doxorubicine (**Tableau 1**).

B. Développement d'une métastase osseuse

Une métastase correspond à un foyer tumoral secondaire distinct du site primaire. La dissémination des cellules tumorales du site primaire au site secondaire se fait par voie sanguine ou lymphatique. Chaque tumeur primaire est connue pour métastaser à un organe-cible préférentiel. En 1889, Stephan Paget proposa l'hypothèse dite du « seed and soil » selon laquelle les cellules tumorales métastasent dans un environnement qui leur est propice (24). Le cancer du sein métastase préférentiellement à l'os, aux poumons et au foie. Actuellement, on estime que 70% des cancers du sein avancé métastasent à l'os (25) qui représente ainsi un environnement propice aux cellules tumorales pour qu'elles s'y installent, y survivent et prolifèrent : il s'agit de la niche pré-métastatique.

1. L'échappement des cellules tumorales vers l'os

De nombreuses études ont montré que la tumeur mammaire primaire conditionnait l'environnement osseux en sécrétant notamment des facteurs circulants tels l'ostéopontine, qui participe au recrutement des cellules de la moelle osseuse et la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) qui favorise la résorption osseuse. Les cellules fibroblastiques de la niche pré-métastatique libèrent en échange des facteurs tels CXCL-12 qui vont à leur tour attirer les cellules tumorales dans l'os (26). Le passage des cellules tumorales vers la circulation sanguine ou lymphatique est appelé l'intravasation. Dans la circulation sanguine, les plaquettes jouent un rôle majeur : en adhérant aux cellules métastatiques, elles les protègent des cellules immunitaires dans le sang (27) et elles participent à leur adhésion à l'endothélium vasculaire et à leur sortie de la circulation sanguine, appelée extravasation.

La migration ciblée des cellules tumorales vers l'os dépend de différents facteurs produits par les ostéoblastes et les cellules stromales de la moelle osseuse. Parmi eux, une forte expression de la cytokine CXCL-12 a été mise en évidence au niveau des cellules endothéliales de la moelle osseuse (28, 29). L'expression de son récepteur, CXCR4, par les cellules métastatiques est associée à la stimulation de la résorption osseuse par augmentation de la synthèse de RANK-L par les ostéoblastes (28). RANK-L jouerait ainsi le rôle de chimio-attractant dans la colonisation de l'os par les cellules métastatiques (30). Sa surexpression dans les tumeurs entraîne une stimulation de la libération de la métalloprotéase MMP-9 qui induit une augmentation de l'invasion *in vitro* et la formation de métastases osseuses *in vivo* (31). De plus, des taux circulants élevés de RANK-L ont été trouvés dans le sérum de patients présentant un cancer métastatique (32).

Enfin, les cellules tumorales métastatiques ayant colonisé l'os doivent s'adapter à l'environnement osseux en exprimant des gènes normalement exprimés par les cellules osseuses. L'analyse immuno-histochimique de métastases osseuses d'une patiente atteinte d'un cancer du sein a révélé l'expression de protéines osseuses telles la cathepsine-K, l'ostéonectine, Runx2 (33). Ce phénomène est appelé l'ostéomimétisme.

2. Les métastases osseuses ostéolytiques

Les métastases osseuses observées dans le cadre d'un cancer du sein sont majoritairement ostéolytiques. Les cellules cancéreuses dans l'environnement osseux produisent des facteurs pro-ostéoclastiques et pro-ostéoblastiques qui perturbent l'équilibre entre formation et résorption osseuse. Dans le cas de métastases ostéolytiques, un excès de résorption osseuse est observé et visible par radiographie (**Figure 6**).

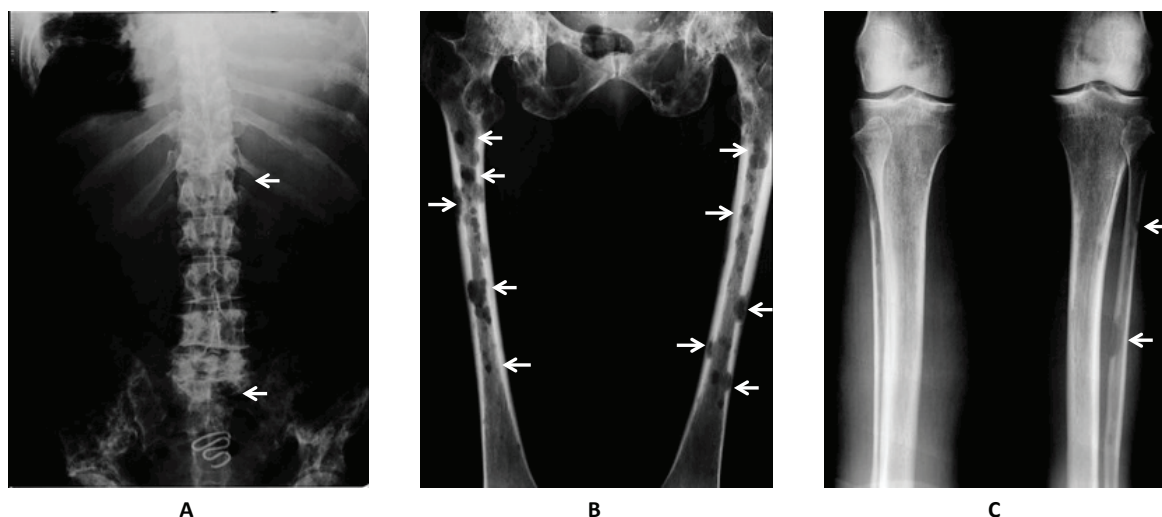


Figure 6 : Métastases osseuses ostéolytiques

Radiographies d'une patiente âgée de 55 ans, ayant initialement une tumeur mammaire. (A) Radiographie de la colonne lombaire. (B) Radiographie du bassin. (C) Radiographie des membres inférieurs. Les lésions ostéolytiques sont indiquées par les flèches blanches. Images : mypacs.net, Hôpital Universitaire de Genève, Suisse.

La destruction de l'os ou ostéolyse n'est pas réalisée par les cellules tumorales elles-mêmes. Elle résulte d'une augmentation de l'activité des ostéoclastes sous l'effet de facteurs sécrétés par les cellules tumorales. Celles-ci sont également capables d'inhiber la formation osseuse. Au cours de la résorption osseuse, des facteurs de croissance et du calcium emprisonnés dans la matrice osseuse sont libérés et peuvent alors stimuler à leur tour la croissance des cellules tumorales. On parle alors de « cercle vicieux » (34-36).

Interactions entre les cellules tumorales et les cellules osseuses

Les cellules tumorales sécrètent un peptide, la PTHrP, capable de se fixer au récepteur de la PTH (PTH-1R), présent à la surface des ostéoblastes. Ceci induit l'expression de RANK-L, réprime celle de l'OPG, ce qui induit la formation d'ostéoclastes et qui à terme conduit à une augmentation de la résorption osseuse (37-39). Des interleukines sont également libérées par les cellules tumorales (IL-6, IL-8, IL-11) (40-42). Parmi elles, IL-6 est connue pour stimuler la destruction osseuse en favorisant la production de RANK-L par les ostéoblastes et en induisant l'expression de PTHrP, IL-8, IL-11 et Cox-2 (Cyclooxygénase-2) par les cellules tumorales. Elle est également capable d'inhiber la formation osseuse en stimulant l'expression d'inhibiteur tel Dkk-1 (43) (**Figure 7**). Les cellules tumorales peuvent également inhiber l'activité des ostéoblastes en sécrétant par exemple de la sclérostine et Noggin qui vont inhiber respectivement les voies de signalisation Wnt et BMP, impliquées dans la différenciation ostéoblastique (44).

Libération de calcium et de facteurs par la matrice osseuse

Lorsque la matrice osseuse est détruite, des facteurs tels le TGF- β (45), l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) (46) mais également du calcium sont libérés et affectent en retour la prolifération des cellules tumorales (47, 48). Celles-ci expriment en effet le récepteur CASR (Calcium-Sensing Receptor) auquel le calcium peut se lier et stimuler la prolifération des cellules tumorales *via* la sur-expression de la PTHrP (49). Le TGF- β libéré de la matrice osseuse induit la production de PTHrP et de prostaglandine E2, conduisant à un excès de résorption osseuse (**Figure 7**).

L'axe ATX/LPA

Enfin, l'implication des plaquettes sanguines a été démontrée au laboratoire et vient renforcer le cercle vicieux pré-existant. L'interaction entre les cellules tumorales et les plaquettes sanguines entraîne une agrégation plaquettaire et la production d'un lipide, le LPA (acide lysophosphatidique) par ces dernières. Le LPA stimule la prolifération tumorale et la sécrétion de facteurs ostéoclastiques (50-53). (**Figure 7**).

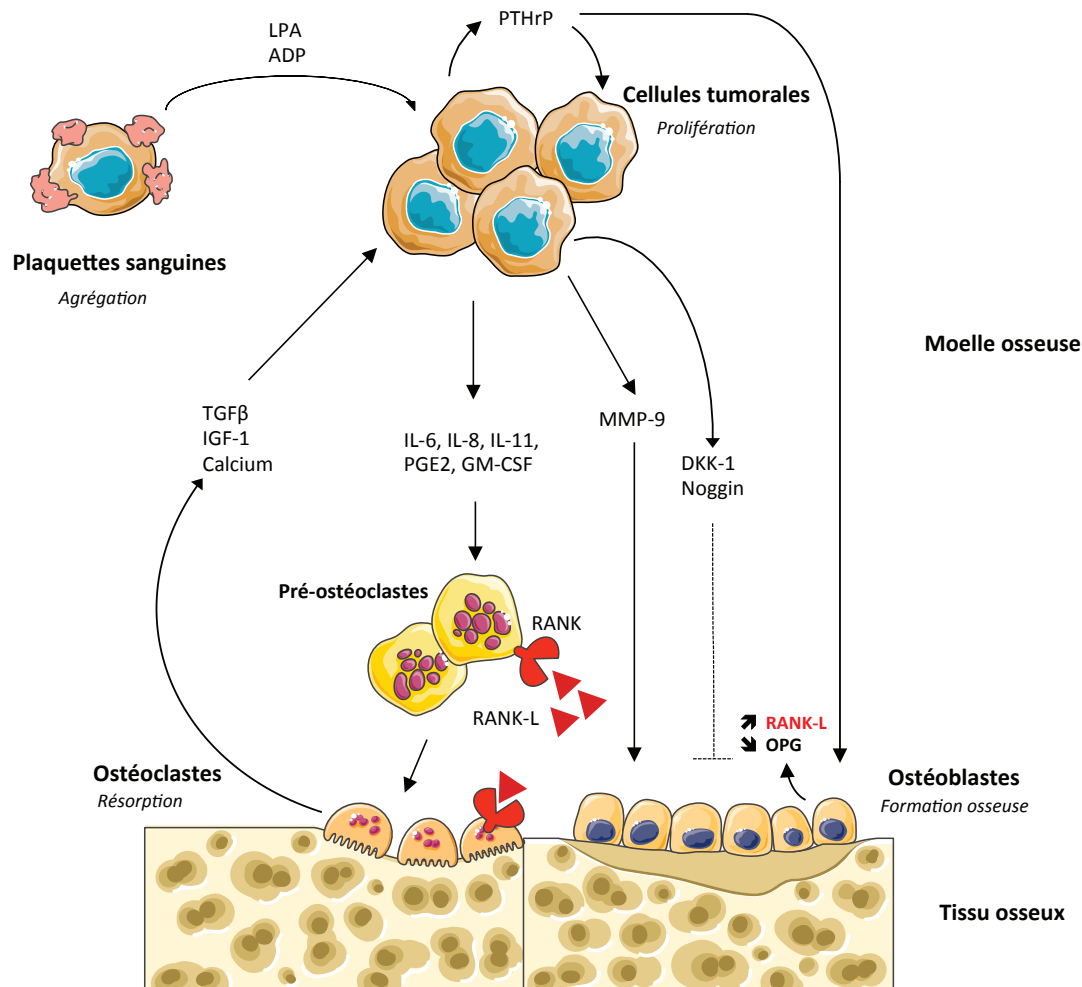


Figure 7 : Le cercle vicieux des métastases osseuses

Les cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse libèrent des facteurs stimulant l'ostéoclastogénèse ainsi que l'augmentation d'activité des ostéoclastes. Elles stimulent également la production de RANK-L par les ostéoblastes ce qui contribue à la différenciation des ostéoclastes. La formation osseuse est inhibée par la libération de facteurs par les cellules tumorales mais également par des signaux afférents de l'hypothalamus. La destruction osseuse induite conduit à la libération de facteurs qui, à leur tour, stimulent la prolifération et l'adhésion des cellules tumorales. Enfin, suite à leur interaction avec les cellules tumorales, les plaquettes s'agrègent ce qui entraîne la production de LPA qui stimule la prolifération tumorale.

C. Symptômes cliniques des métastases osseuses

Les symptômes cliniques des métastases osseuses dépendent du nombre de lésions osseuses et de leur situation. Les sites les plus touchés sont le rachis, le bassin, les côtes, le sternum, les fémurs, les humérus et enfin le crâne. Suite à l'augmentation de la résorption osseuse, l'os est plus fragile et plus sujet aux fractures pathologiques. Une hypercalcémie et des compressions médullaires peuvent également se produire avec l'apparition de troubles moteurs et/ou sphinctériens. Ces deux complications peuvent engager le pronostic vital. Enfin, l'un des symptômes majeurs demeure la douleur liée à la libération de neuromédiateurs tels les prostaglandines qui entretiennent une situation inflammatoire.

Sporadiques au début de l'apparition des métastases osseuses, elles deviennent continues et finalement invalidantes, affectant ainsi la qualité de vie des patientes (34).

D. Traitement des métastases osseuses

Le traitement des métastases osseuses a une visée palliative. Il a pour but de limiter la croissance tumorale dans l'os, de soulager la douleur, de prévenir ou de traiter les complications telles les fractures ou l'hypercalcémie et enfin de permettre au patient de conserver sa mobilité et une certaine qualité de vie.

1. Traitements locaux

Chirurgie

La chirurgie est indiquée pour des patients présentant un os à haut risque de fractures ou déjà fracturé. La méthode employée dépend de la localisation de l'os : en cas d'os portant, des vis et des plaques sont utilisées pour le consolider ; en cas d'os situé au niveau du genou ou de la hanche, il est possible de retirer l'os endommagé et de le remplacer par une prothèse. En cas de compression médullaire, la chirurgie peut également être complétée d'une laminectomie qui permet d'enlever une ou plusieurs parties postérieures et latérales d'une vertèbre (54). La cimentoplastie est indiquée en cas de lésions vertébrales et consiste à injecter dans la lésion osseuse du ciment chirurgical constitué d'une résine, le polyméthacrylate de méthyle. En cas de contre-indication à la chirurgie, une stabilisation externe peut être mise en place au moyen d'appareil orthopédique ou de plâtre par exemple.

Radiofréquence

La radiofréquence a pour but de détruire la tumeur et obtenir ainsi un effet antalgique. La destruction thermique est obtenue par l'insertion d'électrodes dans la tumeur (55, 56). Cette technique est douloureuse et limitée car elle ne peut pas être réalisée si les métastases sont proches de la moelle épinière, du cerveau, de la vessie et du côlon.

Radiothérapie externe

La radiothérapie externe permet un soulagement des douleurs chez environ 70 à 80% des patients. Elle consiste à ioniser les molécules d'ADN des cellules tumorales. Ce processus engendre la formation de radicaux hydroxyl toxiques pour l'ADN cellulaire. L'irradiation externe peut être réalisée une seule fois ou fractionnée (57, 58).

2. Traitements systémiques

Radiothérapie

La radiothérapie systémique repose sur l'utilisation de radio-isotopes : le strontium-89 (59) et le samarium-153 (60, 61). Cependant, l'utilisation de ces deux isotopes peut engendrer une myélosuppression (62). Plus récemment, le radium-223 a montré son intérêt sur la survie de patients atteints de cancer de la prostate dans un essai clinique de phase III (62, 63) tout en étant mieux toléré.

Chimiothérapie et hormonothérapie

La chimiothérapie et l'hormonothérapie, toutes deux déjà utilisées pour le traitement de tumeurs primaires mammaires peuvent également être employées dans le traitement de métastases osseuses.

Inhibiteurs de la résorption osseuse

La compréhension des mécanismes impliqués dans la progression des métastases osseuses a conduit à l'utilisation d'inhibiteurs de la résorption osseuse dont les bisphosphonates (BPs) et plus récemment le denosumab (64-68). Le denosumab est un anticorps monoclonal humain anti-RANK-L. Une étude clinique de phase II a démontré un potentiel anti-résorptif supérieur du denosumab sur les BPs (67). Les effets secondaires des BPs les plus courants demeurent l'ostéonécrose de la mâchoire et la toxicité rénale (69, 70).

Cette thèse s'est intéressée aux BPs qui sont, avec les anti-RANK-L un traitement de référence des métastases osseuses. Leurs structures et modes d'actions sont explicités dans la partie III de ce chapitre.

Autres traitements

D'autres thérapies sont également en cours d'évaluation. C'est le cas par exemple d'anti-cathepsine K qui diminuent la destruction osseuse et la masse tumorale dans un modèle murin de métastase osseuses (71). Parmi les nombreuses stratégies, cibler les ostéoblastes (72, 73) et la matrice osseuse (74) sont également à l'étude.

III) LES BISPHOSPHONATES

Les bisphosphonates (BPs) ont été synthétisés pour la première fois en 1865. Ils sont indiqués pour plusieurs pathologies comme la maladie de Paget (75), l'ostéoporose (76) et les métastases osseuses (77, 78).

A. Structure et activité des BPs

Les BPs sont des analogues structuraux du pyrophosphate inorganique (PPi). L'atome d'oxygène impliqué dans la liaison P-O-P du PPi est remplacé par un atome de carbone, donnant lieu à une structure P-C-P. Autour du carbone central, se trouvent deux chaînes latérales : le groupe R1 et le groupe R2. Leurs structures chimiques définissent respectivement l'affinité du BP pour l'hydroxyapatite (79) et la puissance relative à inhiber la résorption osseuse (80) (**Figure 8**).

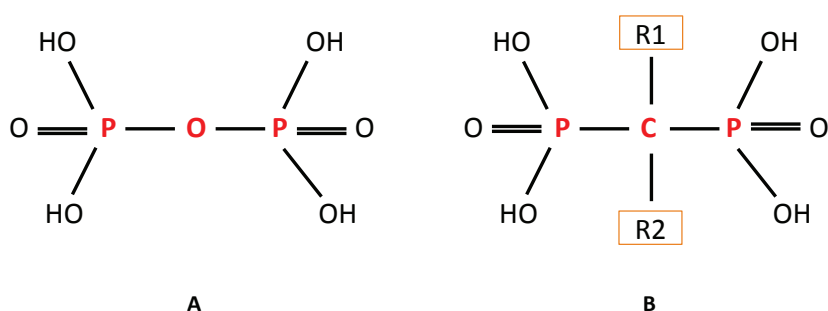


Figure 8 : Structure du PPi et des BPs

(A) Structure du PPi. (B) Structure des BPs. La chaîne R1 est impliquée dans l'affinité du BP pour l'hydroxyapatite. La fixation est plus forte lorsque R1 est un groupe hydroxyl -OH. La chaîne R2 détermine la puissance du BP à inhiber la résorption osseuse.

Comme les PPi, les BPs présentent une structure tridimensionnelle capable de se lier à des ions métalliques divalents tels le Ca^{2+} . Ils se fixent aux atomes de calcium présents à la surface de l'os, au niveau des lacunes de résorption, par le biais de la structure P-C-P associée à la chaîne R1 si celle-ci est un groupe hydroxyl. L'affinité du BP pour l'hydroxyapatite peut encore être augmentée si la chaîne R2 comporte un atome d'azote dans un groupement alkyl ou dans un hétérocycle. La liaison à l'hydroxyapatite est alors assurée par la formation d'un complexe N-H-O. La présence ou l'absence d'un atome d'azote dans la chaîne R2 distingue deux groupes au sein des BP : les amino-bisphosphonates (N-BPs) et les non-amino-bisphosphonates (non N-BPs). Ces deux groupes se différencient par leur mode d'action et également par leur puissance inhibitrice puisque les N-BPs sont 100 à 20000 fois plus puissants que les non-N-BPs (81). Dans cette thèse, nous avons utilisé l'acide zolédronique ou zolédronate (ZOL) qui est le BP présentant la meilleure puissance inhibitrice. Sa structure chimique se caractérise par une structure P-C-P sur laquelle se fixe une chaîne R1, composée d'un groupe hydroxyl, et une chaîne R2 comportant un hétérocycle aminé (**Figure 9**).

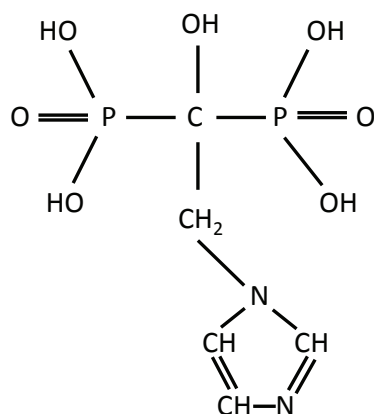


Figure 9 : Structure chimique du ZOL

La structure chimique du ZOL est basée sur une structure phosphate-carbone-phosphate (P-C-P). Deux chaînes R1 et R2 sont liées au carbone central. La chaîne R1 est un groupement hydroxyl qui confère au bisphosphonate sa forte affinité pour le minéral osseux. La chaîne R2, dans le cas du ZOL se compose d'un cycle azoté.

B. Distribution cellulaire et tissulaire des BPs

Deux voies d'administration des BPs ont été évaluées : lorsqu'ils sont administrés par voie orale, ils présentent une faible biodisponibilité (0,3 à 7%). Ceci s'explique par leur faible affinité pour les lipides et leur poids moléculaire (supérieur à 150 Da) qui empêche leur transport à travers les cellules. Par ailleurs, ils sont chargés négativement ce qui complique le passage de la muqueuse intestinale (82). L'administration intraveineuse est donc largement privilégiée. Elle peut cependant conduire à des effets secondaires rénaux (83) ou à une hypocalcémie. La demi-vie du ZOL circulant est brève, entre 30 minutes et 2 heures chez l'Homme. Ils sont ensuite éliminés par voie urinaire, sans métabolisme intermédiaire (84, 85). Plus de 50% du ZOL demeurent stockés dans l'os, au niveau des zones de fort remodelage osseux (85). Leur demi-vie osseuse est au contraire particulièrement longue et peut s'échelonner de plusieurs mois à plusieurs années. Cette caractéristique explique notamment l'effet prolongé rémanent observé en clinique.

Au niveau de l'os, les BPs se retrouvent préférentiellement dans l'os trabéculaire ainsi que dans les sites en cours de résorption (82). Cette liaison à l'os leur permet d'être soumis aux phénomènes de remodelage osseux : ils sont ainsi progressivement libérés lors de dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes actifs (86). L'acidification de la lacune de résorption par les ostéoclastes induit en effet une protonation des groupements phosphates des BPs diminuant ainsi leur affinité pour le calcium et favorisant leur libération à la surface de l'os (87). Les BPs peuvent alors repasser dans la circulation sanguine où ils

seront à nouveau soit éliminés par le système rénal soit redistribué dans l'os. Les BPs s'accumulent également dans d'autres organes tels le foie, l'estomac et la rate (88).

C. Internalisation cellulaire des BPs

Les BPs sont chargés négativement et ne peuvent ainsi pas franchir la membrane plasmique par diffusion. Leur internalisation demeure encore méconnue mais l'utilisation de BPs radiomarqués ou fluorescent a démontré qu'ils sont internalisés par pinocytose et endocytose non spécifique. L'inhibition de la croissance de l'amibe *Dictyostelium discoideum* par les BPs a démontré qu'ils étaient internalisés par endocytose (89). Ils sont ensuite retrouvés dans le cytoplasme et dans les mitochondries notamment (90). La pénétration des BPs par endocytose dépend également de la capacité des cellules à internaliser des drogues. La mise en évidence de ce phénomène a été réalisée *in vitro* en cultivant des ostéoclastes dans un milieu riche en calcium (89, 91). Les ions Ca^{2+} stimulent l'internalisation des BPs dans les cellules. Les pompes à protons H^+ -ATPase, nombreuses en particulier chez les ostéoclastes, permettent l'acidification des vésicules intracellulaires et induisent la déprotonation des BPs. Ce phénomène leur permet alors de traverser la membrane des vésicules et d'être ainsi libérés dans le cytoplasme (91). La forte liaison des BPs à l'os trabéculaire leur permet d'être en contact avec les ostéoclastes. Ainsi, durant la résorption osseuse, l'acidification du pH dans les lacunes de résorption augmente et favorise la dissociation des BPs de l'hydroxyapatite (92). Les BPs libérés de la matrice osseuse peuvent former des complexes avec le calcium osseux et être internalisés par les ostéoclastes préférentiellement par endocytose (81). L'utilisation d'un BP fluorescent (l'alendronate) fixé sur une lamelle de dentine a permis de visualiser son internalisation dans des ostéoclastes de lapin qui la dégradent (**Figure 10**) mais également dans des macrophages J774, des ostéoblastes, des cellules tumorales de la lignée MCF-7 ainsi que dans des monocytes (87, 93). Il a cependant été montré que la quantité de BPs internalisée dans des cellules qui n'ont pas d'activité résorptrice est faible (87). L'acidification des vésicules d'endocytose demeure une étape clé afin que les BPs puissent passer des vésicules d'endocytose organites cibles et agir sur leurs cibles moléculaires.

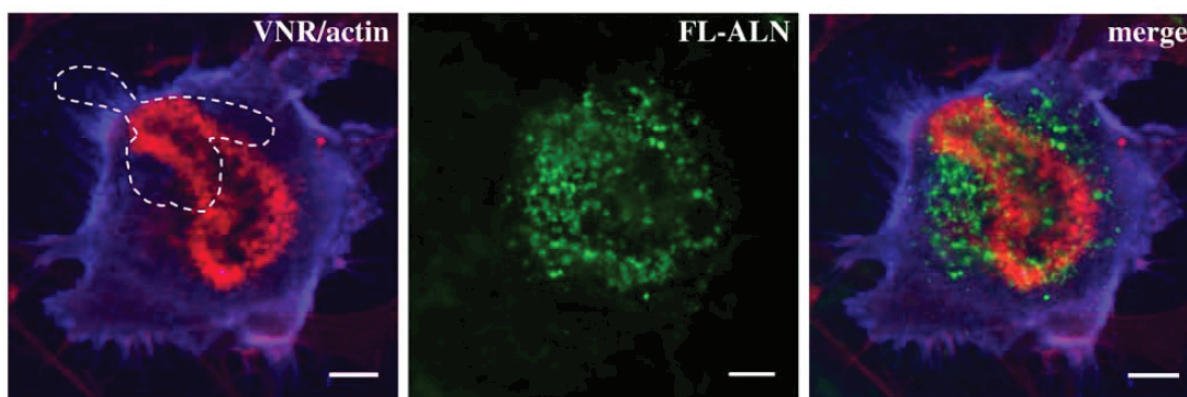


Figure 10 : Internalisation de l'alendronate fluorescent dans des ostéoclastes

L'ostéoclaste en cours de résorption apparaît en bleu, ses filaments d'actine sont colorés en rouge (image VNR/actin). Le BP fluorescent (l'alendronate) apparaît en vert (image FL-ALN) et est intégré sous forme de spots dans les ostéoclastes qui dégradent la dentine (image merge). D'après Coxon et al. (87).

De plus, il a été démontré plus récemment que les BPs pouvaient agir sur d'autres cellules osseuses que les ostéoclastes : à des doses faibles (entre 10^{-9} et 10^{-6} M), ils préviennent l'apoptose des ostéocytes et des ostéoblastes en stimulant l'ouverture des hémiconnexons-43. Cet effet a été mis en évidence chez les non-N-BPs et les N-BPs et peut expliquer l'impact des BPs sur la diminution des fractures (94).

D. Cibles moléculaires des BPs

Après leur internalisation, les BPs agissent sur différentes voies métaboliques. Leur mode d'action dépend de leur chaîne R2. Les N-BPs se distinguent alors des non N-BPs. Les non N-BPs se substituent à l'adénosine triphosphate (ATP) par l'intermédiaire d'une enzyme, l'aminocyl-tRNA synthase, pour former un métabolite AppCp, cytotoxique pour les cellules (95). Ces métabolites s'accumulent dans la cellule et entraînent son apoptose (81). Le mode d'action des N-BPs est différent. Leur structure ne leur permet pas d'être reconnu par l'aminocyl-tRNA synthase et ils ne sont donc pas métabolisés. A des concentrations de l'ordre du nanomolaire, les N-BPs inhibent une enzyme, la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) et agissent sur une voie de signalisation, la voie du mévalonate.

L'action de la FPPS est la suivante : dans un premier temps, elle catalyse la condensation du substrat diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) avec une molécule d'isopentenyl pyrophosphate (IPP) pour former du géranylpyrophosphate (GPP) ; dans un second temps, elle catalyse la condensation du groupement GPP avec une deuxième molécule d'IPP pour former du farnesyl pyrophosphate. Ceci est rendu possible par la présence de deux sites actifs au sein de la FPPS susceptibles de fixer le groupement GPP/DMAPP et l'IPP. Les N-BPs se fixent sur l'un de ces deux sites pour bloquer l'action de l'enzyme. Notamment, les

groupements phosphates de la structure P-C-P peuvent former des liaisons divalentes avec les résidus aspartate de la FPPS au sein du site IPP (96). De plus, l'atome d'azote contenu dans la chaîne R2 des BPs peut se lier à des acides aminés de la FPPS au moyen de liaisons hydrogènes (96). La liaison est optimale pour une distance de 3 ångström. Ainsi, la composition de la chaîne R2 influence la capacité des BPs à se lier, plus ou moins fortement, à la FPPS. C'est ainsi que le ZOL présente un potentiel plus fort à inhiber la FPPS que d'autres N-BPs.

La voie du mévalonate est une voie de signalisation impliquée notamment dans la formation du cholestérol et d'isoprénoïdes (dolichol, ubiquinone) mais aussi dans la prénylation de protéines de signalisation GTPases. La prénylation est une modification post-traductionnelle stable ajoutant un acide gras farnesyl ou géranylgéranyl à un résidu cystéine au niveau de l'extrémité C-terminale des protéines G *via* l'action de deux enzymes : la farnésyl-transférase (FTase) et la géranylgéranyl transférase (GGTase 1 et 2). La prénylation de protéines telles Ras et Rho est indispensable à la survie et la prolifération des protéines du cytosquelette. Ainsi, l'inhibition de la FPPS par les N-BPs induit le blocage de la prénylation de ces protéines ce qui désorganise le cytosquelette d'actine et induit l'inactivation puis l'apoptose des ostéoclastes (**Figure 11**).

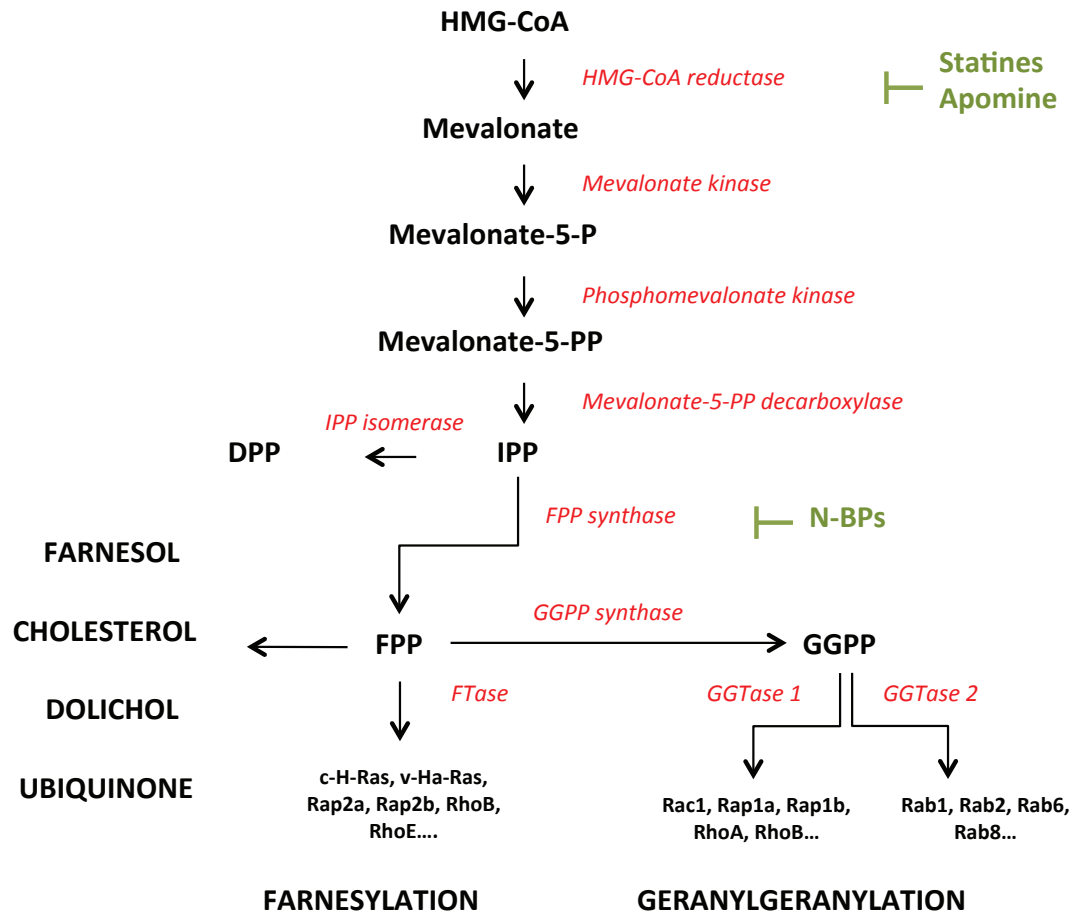


Figure 11 : La voie du mévalonate et son inhibition par les N-BPs

Les N-BPs agissent sur la voie du mévalonate dont les fonctions sont la synthèse de cholestérol, de lipides isoprénoides et la prénylation de protéines. Les N-BPs inhibent la FPPS bloquant ainsi la prénylation de petites protéines G nécessaires à la survie des ostéoclastes.

L'inhibition de la FPPS entraîne l'accumulation de métabolites en amont de la voie du mévalonate, notamment de l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) (91). La condensation d'IPP accumulé avec de l'adénosine monophosphate (AMP) induit la synthèse d'un analogue structural de l'ATP : l'acide 1-adénosine-5-yle ester 3-(3-méthylbut-3-enyle) ester triphosphate (ApppI) (97) (**Figure 12**). L'ApppI induit alors l'apoptose des ostéoclastes par l'inhibition de l'adénine nucléotide translocase (ANT) des mitochondries (97). L'effet apoptotique dépend de la quantité d'ApppI accumulée dans les cellules et par voie de fait, de l'accumulation d'IPP.

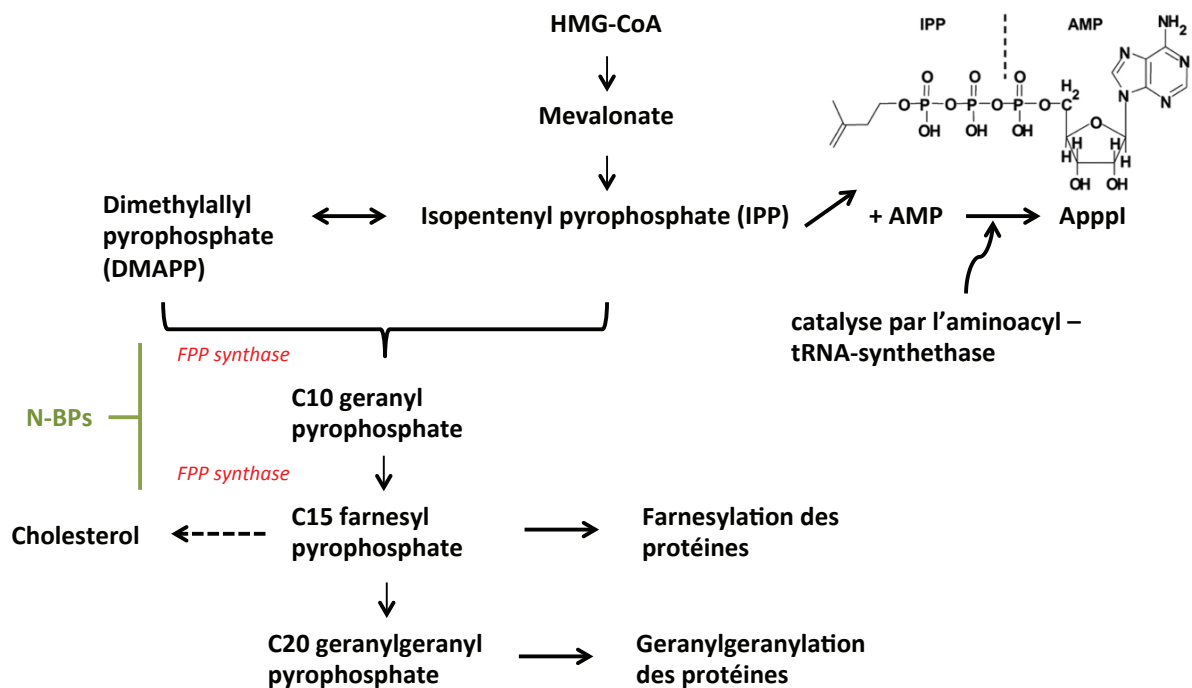


Figure 12 : Synthèse de l'ApppI

L'inhibition de la FPPS par les N-BPs entraîne une accumulation d'IPP qui se lie à une molécule d'AMP pour former de l'ApppI, cytotoxique pour les cellules.

E. Le ZOL dans le traitement des métastases osseuses

Les BPs sont prescrits en prévention des complications des métastases osseuses notamment du cancer de la prostate et du sein ainsi que dans d'autres pathologies comme la maladie de Paget et le myélome multiple. Les indications des BPs concernent la correction de l'hypercalcémie (98) et la prévention de la perte osseuse (99). Ils préviennent également l'apparition de douleurs et augmentent la qualité de vie des patients (100-102). Leur action n'est que palliative. Le clodronate et le pamidronate ont d'abord été les BPs les plus administrés chez des patients atteints de cancer du sein ou de myélome multiple (103, 104). Le ZOL est apparu comme plus puissant et est indiqué dans le traitement de métastases osseuses des tumeurs solides et du myélome multiple (100, 105-107). Il est injecté une fois par mois, par voie intraveineuse, et à la posologie de 4 mg pour un patient d'environ 60 kg. La durée du traitement est variable, mais une étude a montré qu'un traitement de 2 ans était bien toléré (108). A cette posologie, il présente plusieurs effets secondaires dont une hypocalcémie, une toxicité rénale et l'apparition d'ostéonécrose de la mâchoire. L'hypocalcémie est commune à tous les BPs mais peut être contrôlée par une supplémentation en calcium et en vitamine D. Une diminution de la fonction rénale, attestée par une augmentation de la créatinine sérique, a été notée chez environ 11% des patients traités avec cette posologie de ZOL (105). C'est un effet secondaire rare dont l'incidence

varie selon le BP (99). La plupart des cas de toxicité rénale sont réversibles mais quelques cas de toxicité aiguë ont été notés après l'administration de ZOL (83). L'ostéonécrose de la mâchoire est un autre effet noté avec certains BPs (109, 110) et dépend de la dose et de la durée du traitement (111). Si le ZOL est efficace pour stopper la progression des lyses osseuses et soulager la douleur liée aux métastases osseuses, son impact sur la survie globale des patients demeure cependant discuté (112, 113).

F. Activité antitumorale des BPs

Les BPs sont utilisés en clinique pour leur capacité à bloquer la résorption osseuse. Cependant, de nombreuses études font état d'un potentiel antitumoral et affectant différentes étapes de la dissémination métastatique.

1. Action directe des BPs

Adhérence cellulaire

Les effets des BPs sur la diminution de l'adhésion cellulaire ont été démontrés sur plusieurs lignées tumorales d'origine prostatique (PC-3, DU-145) et mammaire (MDA-MB-231, MCF-7) (114, 115) à des concentrations de l'ordre du picomolaire. De manière intéressante, une corrélation a été établie entre l'inhibition de l'adhésion cellulaire par les BPs et leur puissance relative à inhiber la résorption osseuse *in vivo* (114). Les mécanismes exacts demeurent méconnus mais plusieurs pistes sont évoquées : parmi celles-ci, l'effet des BPs sur l'adhésion pourrait être relatif à l'inhibition de la voie du mévalonate puisqu'il a été montré que des non-N-BPs inhibaient moins l'adhésion cellulaire que des N-BPs (114). D'autre part, comme nous l'avons vu précédemment, la prénylation des petites protéines G peut être affectée par les N-BPs. Or, la non prénylation des petites protéines G peut inhiber l'expression de récepteurs de surface comme les intégrines. Il a ainsi été démontré que le ZOL diminuait l'expression de molécules d'adhérence telles ICAM-1, VCAM-1, CD40 à la surface de cellules stromales (116, 117) mais également l'expression des intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ impliquées dans l'adhésion de cellules endothéliales embryonnaires HUVEC (118). Ces résultats sont cependant discutés puisqu'une autre étude a démontré que les BPs n'agissaient pas sur l'expression des intégrines mais plutôt sur la phosphorylation et l'activation de FAK (Focal Adhesion Kinase), protéine qui s'auto-phosphoryle après l'activation des intégrines (119).

Invasion cellulaire

Le ZOL inhibe l'invasion des cellules tumorales d'origine mammaire (MDA-MB-231) et prostatique (PC-3) (120) suite au blocage de la voie du mévalonate (121). Des métabolites de la voie du mévalonate (le géranylgéraniol et le farnésol) sont ainsi capables de prévenir l'effet inhibiteur des BPs sur l'invasion (122, 123). De plus, en bloquant la prénylation de la protéine RhoA, le ZOL induit une désorganisation du cytosquelette d'actine et de fait, inhibe l'invasion des cellules mammaires MDA-MB-231 et de cancer ovarien Caov-3 (123, 124). A des concentrations plus importantes (10^{-4} M (molaire)), les BPs inhibent l'activité des métalloprotéases, impliquées dans la dégradation de la matrice nécessaire à la migration des cellules tumorales (120, 125). Cet effet est cependant indépendant de l'inhibition de la voie du mévalonate puisque des non N-BPs sont aussi efficaces que les N-BPs (114). Enfin, à des concentrations de l'ordre du micromolaire, le ZOL inhibe l'expression de CXCR4 dans les cellules MDA-MB-231 (123) et perturbe ainsi le tropisme osseux des cellules tumorales au site osseux.

Prolifération et survie cellulaire

Les BPs sont capables d'agir sur la prolifération et la survie des cellules tumorales à des concentrations élevées (de 0,1 à 10 M). Cet effet a été démontré sur de nombreuses lignées notamment mammaires et prostatiques (126-129). L'effet des BPs sur la prolifération est dépendant de l'inhibition de la voie du mévalonate. L'inhibition de la prénylation des petites protéines G (telles Ras) bloque les voies de signalisation PI3K/Akt/NFκB et Raf-1/MAPK/ERK-1 et ERK-2, dépendantes de Ras ce qui entraîne la neutralisation du signal pro-apoptotique et le blocage de la prolifération cellulaire (130, 131). La libération du cytochrome C dans le cytosol et l'activation de la caspase-9 induisent l'apoptose des cellules tumorales (132). Le ZOL induit également, dans des cellules d'ostéosarcome, l'augmentation d'une protéine pro-apoptotique Bax et la diminution concomitante de Bcl-2, anti-apoptotique. Ce résultat souligne les altérations nucléaires faites par un traitement au ZOL (133). L'induction de l'apoptose est également liée à la production d'ApppI, cytotoxique pour les cellules (134). Enfin, le ZOL peut également avoir un effet cytostatique en bloquant les cellules de mélanome, d'ostéosarcome et de myélome en phase S du cycle cellulaire (135-137).

2. Activité anti-angiogénique des BPs

La démonstration de l'activité anti-angiogénique des BPs a été réalisée *in vitro* mais également *in vivo*. Les BPs inhibent la prolifération des cellules endothéliales ce qui permet

de réduire la formation de capillaires sanguins (138-140). Ils réduisent l'angiogenèse dans des expériences de tumorigenèse impliquant des cellules de mélanome (129), de cancer de l'utérus ou des tumeurs mammaires (141). Les effets sont relatifs à une diminution de l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les cellules endothéliales (142) ou par les cellules tumorales (141). Injecté une fois par semaine pendant 6 semaines (100 µg/kg), le ZOL diminue également l'infiltration des macrophages CD11+ dans les tumeurs, ce qui entraîne une diminution de la production de métalloprotéases MMP-9, connue pour libérer le VEGF de la matrice extracellulaire. Par conséquent, le ZOL en diminuant la production de MMP-9 bloque la libération du VEGF de la matrice extracellulaire (143). De plus, il a été montré que la moelle osseuse était un réservoir pour les cellules progénitrices endothéliales, capables de contribuer à la vascularisation de tumeurs primaires (144). Ainsi en bloquant le recrutement de cellules progénitrices endothéliales, les N-BPs pourraient inhiber l'angiogenèse de tumeurs situées à distance du site osseux. En clinique, et suite à une injection de pamidronate ou de ZOL, une diminution prolongée des taux de VEGF circulants a été relevée chez des patients atteints d'un cancer du sein ou de la prostate avec des métastases osseuses (145, 146). Cependant, une étude réalisée chez l'animal a mis en évidence une diminution de l'angiogenèse tumorale sans diminution des taux de VEGF ce qui pourrait suggérer que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'activité anti-angiogénique des BPs (147). Il est important également de souligner que ces effets ont été observés pour des doses supérieures à celles utilisées en clinique (148).

3. Relation des BPs avec les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$

Les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ font partie de la réponse immunitaire contre les cellules tumorales. Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré la capacité des N-BPs à activer les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ en présence d'IL-2. Ces derniers, une fois activés, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et exercent de fait une activité cytotoxique envers les cellules tumorales (149). Cet effet n'est pas retrouvé chez les non-N-BPs ce qui souligne l'implication de la voie du mévalonate. Une étude réalisée au laboratoire a montré que l'IPP et l'ApppI, accumulés suite à la pénétration du N-BP dans les cellules tumorales, sont présentés aux lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ et reconnus alors comme des phospho-antigènes. L'IPP et l'ApppI agissent alors comme des chimio-attracteurs pour les lymphocytes T $V\gamma9V\delta2$ en induisant leur expansion, leur activation et la libération de cytokines pro-inflammatoires (dont IL-6 et

TNF- α) ce qui induit leur cytotoxicité (150, 151). Des études *in vivo* (152) et cliniques (153, 154) ont montré qu'un traitement au ZOL induisait une diminution de la croissance tumorale liée à l'expansion des lymphocytes T V γ 9 δ 2, soulignant un potentiel intérêt du ZOL en immunothérapie dans le traitement du cancer du sein (150, 151).

G. Le ZOL en situation adjuvante

Ainsi, au-delà de son intérêt en situation palliative, le ZOL démontre un potentiel antitumoral en agissant sur de nombreuses cibles. Ces dernières années, son association avec des chimiothérapies et/ou des hormonothérapies a été évaluée. *In vivo*, il a démontré une action synergique lorsqu'il est injecté après de la doxorubicine (155, 156). Dans ces conditions, une augmentation de la survie (157) et une diminution du nombre de cellules tumorales disséminées à l'os sont observées (158). Utilisé en situation néo-adjuvante, il prévient l'apparition de métastases osseuses dans plusieurs modèles tumoraux *in vivo* (159). Plusieurs essais cliniques menés sur des patientes présentant un cancer du sein ont souligné que l'utilisation néo-adjuvante ou adjuvante de BPs diminuait le risque de rechutes et augmentait la survie (160-162). L'essai AZURE a regroupé 3360 patientes pré- ou post-ménopausées (163). Aucun bénéfice n'a été mis en évidence concernant la survie sans maladie ou sur la survie globale. Cependant, un résultat secondaire de cet essai a dégagé un bénéfice de 25% sur la survie sans maladie pour les patientes post-ménopausées depuis 5 ans à leur entrée dans l'étude et ayant reçu une chimiothérapie et/ou une hormonothérapie en association avec du ZOL (163). L'essai ZO-FAST s'est concentré sur des patientes post-ménopausées qui ont reçu un inhibiteur de l'aromatase, le létrozole (164). Cet essai a confirmé un bénéfice de 34% sur la survie sans maladie pour les patientes ayant reçu du ZOL en plus du létrozole. Enfin, l'essai ABCSG-12 s'est terminé récemment. Il s'intéressait à des patientes pré-ménopausées recevant toutes de la goséréline, qui limite la production d'estrogènes, induisant ainsi une ménopause. Les patientes ont également reçu des inhibiteurs de l'aromatase en association ou pas avec du ZOL (165). Cet essai a confirmé un bénéfice à long terme pour la survie sans maladie des patientes ayant reçu du ZOL pendant 3 ans (4 mg tous les 6 mois). De manière intéressante, les effets du ZOL ont été observés dans l'os mais également en dehors : en effet, les patientes ayant reçu du ZOL en plus de l'hormonothérapie ont présenté moins de métastases viscérales ou de récidives que les patientes ayant reçu seulement l'hormonothérapie. Ces essais ont démontré que le statut ménopausal des patientes joue un rôle important dans la réponse à l'association chimiothérapie et/ou hormonothérapie et ZOL. Une étude publiée récemment présente le

rôle de l'activine A, capable d'inhiber *in vitro* la prolifération des cellules ER+ et ER-. L'activine A est elle-même inhibée par la follistatine. *In vitro* et *in vivo*, le ZOL diminue la sécrétion de follistatine uniquement chez des cellules ou des tumeurs ER- ce qui entraîne chez celles-ci l'augmentation de l'activité de la voie de l'activine A et promeut ainsi l'action anti-tumorale de cette dernière (166).

IV) LES ULTRASONS

A. Généralités

Les ultrasons (US) sont des ondes mécaniques dont la fréquence est supérieure à 20000 Hertz (Hz). Elles sont par conséquent inaudibles pour l'oreille humaine dont la plage de perception se situe entre 10 kHz et 20 kHz. Les US sont largement utilisés dans le domaine médical, principalement comme un outil diagnostique avec l'échographie depuis les années 1980. Plus récemment, ils sont devenus des outils thérapeutiques à fort potentiel avec le traitement des calculs rénaux (la lithotritie) et les US focalisés de haute intensité (167, 168) dont les applications sont multiples notamment en oncologie.

1. L'effet piézoélectrique

En 1880, Pierre et Jacques Curie démontrent qu'un cristal de quartz, convenablement orienté et soumis à une pression mécanique, présente une polarisation électrique : c'est l'effet piézoélectrique direct. Lippman établit l'existence du phénomène inverse l'année suivante : un cristal de quartz, soumis à un champ électrique, se comprime ou se dilate. Les travaux réalisés par Chilowsky et Langevin en 1916 et 1917 démontrent comment ce principe peut générer des US. La piézoélectricité est le nom donné au couplage des propriétés mécaniques et électriques d'un matériau. Ce phénomène permet de générer des déformations mécaniques dans un solide soumis seulement à une excitation électrique, et réciproquement de créer des charges électriques par déformation mécanique. La génération et la détection d'ondes mécaniques se fait au moyen d'un élément appelé transducteur. Différentes géométries existent pour un transducteur. Ainsi, ils peuvent être plans, concaves, ou convexes selon la région ciblée.

2. Propagation d'une onde ultrasonore

Les US sont des ondes mécaniques non ionisantes qui nécessitent un support de propagation. Les ondes sont générées par un transducteur soumis à une tension sinusoïdale

qui en vibrant à la même fréquence que le champ électrique va produire l'onde ultrasonore. Sous l'effet du passage de l'onde ultrasonore, les particules constituant le milieu de propagation vibrent autour d'une position d'équilibre (**Figure 13**). Dans les tissus biologiques mous, l'onde ultrasonore se propage selon un mode longitudinal. Une propagation transversale dite de cisaillement apparaît pour les tissus plus durs, comme l'os.

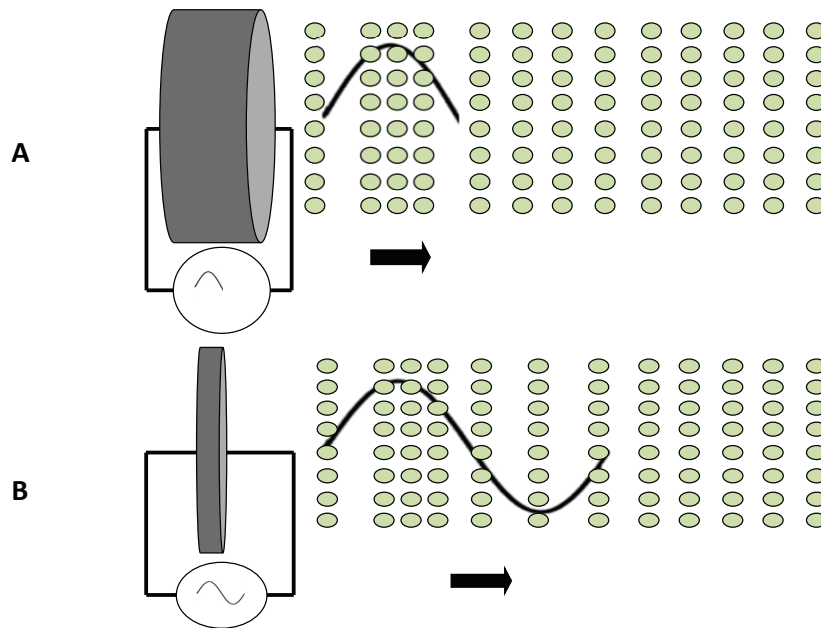


Figure 13 : Contraction et dilatation d'un transducteur

(A) : Sous l'effet d'un champ électrique sinusoïdal, le transducteur se dilate, créant une surpression sur les particules du milieu dans lequel se propage l'onde ultrasonore. (B) Le transducteur se contracte, créant une dépression dans les particules de ce même milieu. Ces phénomènes se répètent ensuite à la fréquence du champ électrique sinusoïdal.

B. Effets biologiques des US

1. Effets thermiques

Lorsqu'une onde ultrasonore traverse un tissu biologique, son intensité décroît avec la distance parcourue : ce phénomène est appelé l'atténuation. Lors de la mise en mouvement des particules, des forces de friction générées par la viscosité des tissus biologiques entraînent une perte d'énergie de l'onde acoustique qui se traduit par une élévation de la température du milieu. En plus de l'absorption, d'autres facteurs contribuent à l'atténuation de l'onde ultrasonore et ainsi à l'élévation de la température du milieu. Ces facteurs sont la divergence du faisceau, la diffusion due à l'hétérogénéité du milieu de propagation et à la propagation selon d'autres modes. L'intensité d'une onde ultrasonore plane se propageant dans un milieu atténuant est donnée par la relation :

$$I = I_0 e^{-2\mu z}$$

où I (en Watts.m^{-2}) est l'intensité à une distance z (en m), I_0 est l'intensité initiale lorsque $z=0$ m et μ est le coefficient d'absorption exprimé en m^{-1} .

La quantité de chaleur apportée par unité de volume Q (exprimée en W.m^{-3}) est donnée par l'équation:

$$Q = 2 \mu I$$

où μ est le coefficient d'atténuation des tissus (en m^{-1}) et I l'intensité de l'onde ultrasonore (en Watts.m^{-2}).

Le coefficient d'atténuation (exprimé en dB.m^{-1}) s'exprime de la façon suivante :

$$\alpha = 20 \mu \log e$$

où μ est le coefficient d'atténuation des tissus (en m^{-1}).

Le coefficient d'atténuation varie de façon non linéaire avec la fréquence selon la relation suivante : $\alpha(f) = a f^b$

où a est le coefficient d'atténuation (exprimé en $\text{dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$), $\alpha(f)$ est l'atténuation de l'onde (en $\text{m}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$), f est la fréquence (MHz) et b le coefficient de non-linéarité. L'atténuation dans les tissus mous est assez faible (graisse et muscles notamment) alors qu'elle est très forte dans les os et les poumons également (**Tableau 2**).

Milieu	a ($\text{dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$)	b
Eau	0,0022	2
Foie	0,45	1,05
Graisse	0,6	0,4
Muscle	0,57	1
Os	22	Non renseigné
Poumon	30	Non renseigné
Sang	0,16	1,23

Tableau 2 : Exemples de valeurs du coefficient d'atténuation (a) de tissus biologiques et de leur coefficient de non linéarité (b)

L'augmentation locale de la température des tissus biologiques est la conséquence d'un équilibre entre la chaleur générée par l'atténuation des ondes ultrasonores et sa diffusion thermique au sein du milieu et par convection *via* la circulation sanguine. La diffusion thermique dépend de la conductivité thermique des tissus. En 1948, Pennes décrit l'équation de transfert de la chaleur dans les milieux biologiques (Bio Heat Transfert Equation) (169) permettant d'estimer l'évolution de la température locale dans les tissus biologiques :

$$\rho_m c_m \frac{\partial T}{\partial t} = k \nabla^2 T - \omega_a c_a (T - T_a) + Q$$

où T est la température des tissus (en °C), k est le coefficient de conductivité thermique des tissus ($\text{W.m}^{-1}.\text{°C}^{-1}$), m est la densité des tissus (en kg.m^{-3}), c_m est la chaleur spécifique des tissus ($\text{J.kg}^{-1}.\text{°C}^{-1}$), w_a le taux de perfusion sanguine (exprimé en $\text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$), c_a la chaleur spécifique du sang ($\text{J.kg}^{-1}.\text{°C}^{-1}$), T_a la température du sang (°C). Le terme $w_a c_a (T - T_a)$ représente la chaleur évacuée par convection *via* les vaisseaux sanguins.

En 1984, Sapareto et Dewey (170) font l'observation qu'un tissu soumis à une température de 43°C durant 4 heures présente les mêmes dommages biologiques qu'un tissu chauffé à 44°C pendant un temps deux fois plus court. Le concept de la dose thermique décrit ainsi les dommages causés dans un tissu après une élévation de la température. La dose thermique permet de comparer des dommages créés par différentes températures appliquées pendant différents intervalles de temps en calculant le temps qu'une température de référence devrait être appliquée pour produire les mêmes dommages. La température de référence est 43°C, on parle alors de temps équivalent t_{43} . La dose thermique t_{43} est alors définie par la relation :

$$t_{43} = \sum_{t=0}^{t_{final}} R^{43-T} \Delta t, \begin{cases} R = 0 & T < 37 \\ R = 0,25 & 37 < T < 43 \\ R = 0,5 & 43 < T \end{cases}$$

où R est une fonction binaire de la température et vaut 0,5 si $T > 43^\circ\text{C}$, 0,25 si T est compris entre 37°C et 43°C et 0 si $T < 37^\circ\text{C}$.

Le seuil produisant une nécrose irréversible des tissus mous est de 14400 secondes (4 heures) à 43°C. Il existe ainsi une relation entre le temps de traitement, la température et les dommages tissulaires permettant de décrire les effets thermiques des US dans les tissus biologiques. Une représentation graphique du concept de temps équivalent à 43°C permet de décrire trois zones : une zone de non destruction lorsque la température et le temps d'exposition ne sont pas assez élevés pour entraîner des dommages tissulaires ; une autre zone correspondant à des températures et des temps d'exposition entraînant des dommages irréversibles et une zone intermédiaire dite d'hyperthermie (**zone rouge ; Figure 14**). Il a été démontré que l'induction d'une hyperthermie des tissus tumoraux favorisait l'action de chimiothérapie et de radiothérapie (171, 172). Cependant, une telle pratique est compliquée notamment parce qu'elle implique l'obtention d'une température stable et homogène de l'ensemble d'un tissu. Ceci est compromis par la perfusion sanguine qui entraîne une

hétérogénéité dans la répartition de la chaleur. Ainsi, des traitements courts mais à forte température ont donné naissance aux traitements par ablathermie ou chirurgie ultrasonore. Cette approche consiste à produire une augmentation brutale de la température en un point donné afin d'entraîner une nécrose tissulaire. Cette technique a été exploitée notamment dans le traitement de tumeurs prostatiques (173).

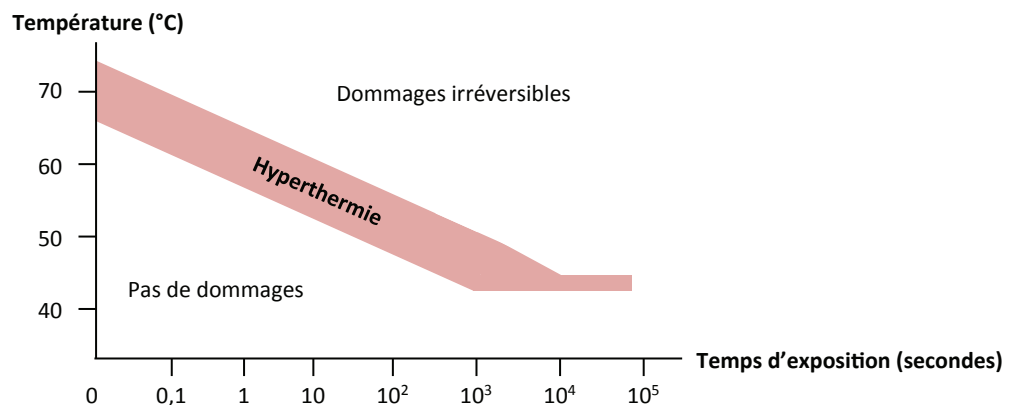


Figure 14 : Dommages d'une hyperthermie sur les tissus en fonction du temps

La destruction des tissus biologiques dépend non seulement de la température appliquée mais également du temps pendant lequel le tissu est chauffé (174).

2. Phénomènes de cavitation

Chaque tissu biologique contient des gaz dissous. Lors du passage d'une onde ultrasonore dans un tissu, des bulles peuvent se former, osciller et imploser : ce phénomène est appelé la cavitation. Elle dépend de plusieurs paramètres comme la température du milieu, la fréquence de l'onde, la présence d'impuretés dans un liquide ou encore la viscosité du milieu. Le « seuil de cavitation » correspond au niveau de pression acoustique à partir duquel la cavitation est initiée. Deux modes de vibration sont actuellement connus : on parle de cavitation stable ou de cavitation inertielle. La cavitation stable est caractérisée par une oscillation régulière et continue autour d'un diamètre moyen d'une bulle. Elle touche les bulles dont le diamètre est associé à une fréquence de résonance proche de la fréquence de l'onde acoustique appliquée. La cavitation inertielle implique que le diamètre des bulles augmente rapidement jusqu'à imploser violemment en une multitude de bulles plus petites. Elle apparaît lorsque l'intensité acoustique est supérieure à $700 \text{ W.cm}^{-2}.\text{MHz}^{-1}$ (175). L'implosion de bulles peut engendrer une onde de choc sphérique dans le liquide et créer de fortes contraintes mécaniques. De plus, elle peut induire localement une élévation brutale de la température et générer une perforation des tissus par l'implosion des bulles (176). L'oscillation de bulles avec la propagation d'une onde ultrasonore permet d'augmenter

l'absorption par le milieu et peut ainsi être un facteur non négligeable dans la formation de lésions dues à une élévation de la température (177). Elle induit également des micro-courants susceptibles de favoriser l'assimilation de drogues dans des cellules (178). La cavitation revêt un caractère difficile à maîtriser puisque son apparition est liée aux caractéristiques des tissus biologiques particulièrement difficiles à estimer *in vivo* (présence d'impuretés, concentration de gaz dissous notamment).

3. Effets mécaniques

Les effets des US ne sont pas uniquement reliés à une élévation de la température. Les US sont des ondes mécaniques qui peuvent affecter le milieu qu'elles traversent en induisant des phénomènes de compression et de dilatation. Ainsi, les ondes de choc sont des variations soudaines de pression. Elles peuvent se propager dans les tissus mous dont les propriétés acoustiques sont proches de celles de l'eau. Ce principe a été mis en œuvre lors du traitement des calculs rénaux appelé lithotritie. Les US génèrent également la pression de radiation : il s'agit d'une force de poussée liée aux transferts de quantité de mouvement dans les tissus. En effet, les US génèrent des phases de pressions tantôt positives, tantôt négatives entraînant un mouvement déphasé lorsque la réaction des tissus à ces transitions n'est pas assez rapide. Ceci entraîne un transfert d'impulsion dans le sens de la propagation de l'onde, susceptible de provoquer le déplacement des tissus. La pression de radiation et les forces mises en jeu lors des phénomènes de cavitation peuvent provoquer l'apparition de micro-courants. La propagation des ondes ultrasonores dans certains milieux solides peut également donner naissance à d'autres modes de propagation. Ainsi, les ondes de cisaillement se propagent plus facilement dans les milieux rigides et les ondes de Lamb se propagent sur la surface de milieux solides comme par exemple le long des os. Ces ondes peuvent induire un stress mécanique sur les tissus biologiques. Les effets ne sont pas encore tous connus ni maîtrisés mais dont une des applications émergente est l'application à l'accélération de la consolidation osseuse (179).

C. Les US thérapeutiques

Ces dernières années, les US sont apparus comme un outil thérapeutique puissant dans de nombreux domaines d'applications. Ils présentent l'avantage d'être non-ionisants et peuvent être utilisés par voie extracorporelle ce qui rend le traitement non invasif. L'effet recherché dépend de la pathologie et du tissu insonifié : il peut être d'ordre thermique, mécanique ou chimique avec la production de radicaux libres. Cette sous-partie s'intéresse aux HIFU

(High Intensity Focused Ultrasound en anglais) en clinique puis aux LIPUS et enfin aux techniques impliquées dans la délivrance de drogues par US. Les HIFU permettent de focaliser le faisceau ultrasonore au niveau de zones tumorales afin de générer une augmentation brutale et courte de la température (jusqu'à 100°C) sans effet délétère pour les tissus avoisinants. Ceci entraîne une nécrose irréversible des tissus ciblés. Ce système présente l'avantage de pouvoir être couplé à une cellule d'imagerie ultrasonore ou couplé à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) permettant le monitoring du traitement ultrasonore. Les champs d'applications englobent aussi bien la cancérologie avec le traitement des cancers de la prostate (173), des tumeurs digestives telles que les tumeurs hépatiques (180, 181) ou pancréatiques (182) mais également d'autres domaines tels que l'ophtalmologie (183), l'obstétrique (184). Les HIFU peuvent être associés à une chimiothérapie afin d'en potentialiser les effets. Dans le domaine osseux, les HIFU réduisent la douleur générée par les métastases osseuses (185, 186) en détruisant notamment les nerfs situés dans le périoste et impliqués dans la sensation douloureuse (185, 187).

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux types d'US : des US pulsés de faible intensité (LIPUS pour Low Intensity Pulsed Ultrasound en anglais) et des US continus de faible intensité (C-US). Dans les deux cas, et comme expliqué précédemment, les US induisent une stimulation mécanique des tissus insonifiés. Dans le cas des C-US seulement, une augmentation de la température a été générée.

D. Stimulation osseuse par US

La stimulation osseuse par US peut être réalisée en utilisant des ondes de choc ou des LIPUS qui ont démontré leur potentiel à accélérer la guérison de 38% après la fracture récente d'un os long (188-191).

1. Ondes de choc

Les ondes de choc consistent en des variations brusques ($<10 \mu s$) de pression d'amplitude positive puis négative (entre 30-100 MPa). En se propageant dans les tissus, elles sont associées à de la cavitation inertielle mais également à des ondes de cisaillement. Dans le domaine osseux, les ondes de choc sont notamment utilisées pour le traitement de fractures non soudées et la pseudarthrose (192). Dans le premier cas, les ondes de choc augmentent le remodelage osseux et les phénomènes d'angiogenèse (193). Les mécanismes impliqués sont mal connus mais certaines études permettent d'avancer l'hypothèse que les ondes de choc pourraient créer des micro-fractures à la surface de l'os ce qui initierait le remodelage

osseux. D'autres expérimentations mettent en évidence une réponse inflammatoire suite à l'application de ces ondes de choc. La présence de phénomènes de cavitation serait reliée à l'apparition de ce phénomène (194, 195).

2. LIPUS

Les LIPUS sont délivrés à des intensités généralement inférieures à 100 mW/cm² SATA (Spatial Average Temporal Average). L'effet recherché ici n'est pas une hyperthermie puisque l'augmentation de température est négligeable (<0,5°C), mais plus une stimulation mécanique des tissus insonifiés. Les mécanismes d'action des LIPUS demeurent partiellement expliqués, même si leurs effets complexes sont largement décrits (196). La difficulté réside dans l'hétérogénéité des paramètres ultrasonores utilisés et dans la complexité du milieu osseux. La majorité des études *in vitro* ont utilisé un système similaire à celui utilisé pour le traitement de fractures en clinique. Le dispositif clinique repose sur un transducteur plan fonctionnant à une fréquence de 1.5 MHz. L'intensité ultrasonore est de 30 mW/cm² (SATA). L'émission ultrasonore dure 200 µs puis s'arrête pendant 800 µs, soit un rapport cyclique (duty cycle) de 20% (197). La durée d'application est de 20 minutes répétée quotidiennement. Cependant, ces paramètres peuvent être modulés. Ainsi, d'autres études basées sur l'utilisation des LIPUS ont été menées avec des paramètres différents, soit au niveau de l'intensité (5 à 2400 mW/cm² (198, 199), de la fréquence (45 kHz à 3 MHz (200)) ou du duty cycle.

Effets biologiques des LIPUS après une fracture

Chacune des étapes impliquées dans la régénération osseuse après une fracture peut être influencée par les LIPUS. Ces derniers agissent sur une grande variété de types cellulaires nécessaires au phénomène de consolidation osseuse (cellules mésenchymateuses, ostéoblastes, ostéoclastes, fibroblastes, cellules endothéliales).

Inflammation et angiogenèse

Immédiatement après une fracture, les fibroblastes créent un tissu granuleux pour supporter la zone lésée et permettre la formation d'un hématome. Il a été démontré que les LIPUS pouvaient stimuler la prolifération des fibroblastes et ainsi favoriser la création rapide de l'hématome (201, 202). La formation de ce dernier est accompagnée de la libération de chimiokines capables d'attirer des cellules inflammatoires mais également des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) au niveau du site fracturé. Dans ce contexte, les LIPUS

stimulent le recrutement au site lésé de précurseurs ostéogéniques (203). Ils stimulent également la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8), impliquée dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales par les pré-ostéoblastes (204). De plus, une augmentation de la production du VEGF a été démontrée sur des ostéoblastes humains et par des monocytes suite à une exposition aux LIPUS (201). Certains radicaux libres, impliqués dans la formation osseuse, sont de bons répondeurs à l'application de LIPUS : ainsi, la production de monoxyde d'azote (NO), de prostaglandine E2 (PGE2) et de COX-2 (cyclooxygenase-2) est augmentée après une stimulation par LIPUS sur des ostéoblastes humains (205).

Ostéogenèse et remodelage osseux

L'étape suivant celle de l'instauration d'une zone inflammatoire est celle de l'ostéogenèse précoce. Les LIPUS affectent celle-ci de différentes façons : ils augmentent l'expression d'IGF-1 ce qui permet d'induire l'expression d'Ostérix, facteur de transcription impliqué dans la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures (206). Deux jours après avoir été appliqués, les LIPUS stimulent l'expression du facteur de transcription Runx2 (207) et induisent la régulation de protéines telles l'ostéonectine, l'ostéopontine, la phosphatase alcaline et des facteurs ostéogéniques comme l'ostéocalcine et le collagène de type 1 (208). L'influence des LIPUS sur la prolifération des ostéoblastes est controversée : des études rapportent qu'ils favorisent la différenciation ostéoblastique et de fait, la formation osseuse (207). D'autres résultats soulèvent l'hypothèse selon laquelle les effets bénéfiques des LIPUS résulteraient d'une augmentation concomitante de la prolifération, de la différenciation et de la maturation ostéoblastique (208). Dans la lignée ostéoblastique ROS 17/2.8 et chez des MSCs, il a été démontré que les LIPUS stimulaient l'expression du facteur de transcription Runx2, impliqué dans la différenciation des ostéoblastes. L'effet des LIPUS a également été étudié dans le système OPG/RANK-L : une augmentation de l'expression du gène codant pour RANK-L a été retrouvée après une stimulation de 3 semaines chez des ostéoblastes murins alors que les niveaux d'OPG sont restés stables pendant l'ensemble de l'expérimentation. Cette étude révèle ainsi que les LIPUS stimulent l'ostéoclastogenèse (204).

Mécanismes impliqués

Les intégrines sont des protéines transmembranaires exprimées par de nombreux types cellulaires. Elles jouent un rôle clé dans la transduction du signal ultrasonore. Ainsi, 24 heures après une stimulation aux LIPUS de 20 minutes, une augmentation de l'expression

des intégrines $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$ et $\beta 3$ a été notée dans des ostéoblastes de rat (209). Le blocage de l'intégrine $\beta 1$ par un anticorps induit la restauration de niveaux basaux de synthèse d'ADN qui avait été augmentée en réponse aux LIPUS (202). En utilisant également une stratégie à base d'inhibiteurs, il a été montré que la stimulation par LIPUS de la différenciation de cellules murines ST2 était liée aux voies de signalisation PI3K et p38 (206). Enfin, une étude a démontré que les LIPUS agissaient sur des chondrocytes bovins par l'intermédiaire de la voie MAPK/ERK : le blocage de la phosphorylation de ERK bloque ainsi l'expression de gènes précoces dont c-fos, c-jun et c-myc observée lors de l'application des LIPUS (210).

Action sur la matrice extracellulaire

On appelle « acoustic streaming » le phénomène qui permet le mouvement de fluide dans une direction et qui permet la circulation de molécules et facilite leur délivrance. Il a été montré qu'en réponse aux LIPUS, les flux d'oxygène et de nutriments étaient favorisés dans des cultures bactériennes (211). La diffusion radiale de bleu de trypan a été observée sous l'effet de LIPUS (212) suggérant un effet lié à l'« acoustic streaming ». Une augmentation des ondes de cisaillement a résulté en une augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'en une augmentation de l'ostéopontine (212).

Effets de synergie impliquant les LIPUS

L'efficacité des LIPUS dans l'accélération d'une guérison après une fracture a conduit à les associer avec d'autres facteurs connus pour jouer un rôle dans la régénération osseuse. C'est par exemple le cas du calcitriol, forme active de la vitamine D, qui, en association avec des LIPUS pendant 5 jours, accroît l'expression de PDGF (Platelet Derived Growth Factor) sur des co-cultures des cellules (HUVEC) et d'ostéoblastes (213). D'autres études ont mis en évidence un potentiel intérêt à associer des LIPUS à des facteurs de croissance comme le TGF- β dans la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes (214).

E. Délivrance de drogues par US

En cancérologie, l'utilisation d'agents cytotoxiques systémiques est largement répandue. Il arrive cependant que la réponse à la chimiothérapie ne soit que partielle voire nulle. La faible distribution du médicament est due à l'organisation des vaisseaux sanguins autour de la tumeur, au faible flux sanguin à proximité et à la forte pression intra-tumorale qui limitent la pénétration de drogues au sein des tumeurs. Ainsi, l'une des solutions consisterait à déposer la drogue localement afin de cibler la tumeur, d'en augmenter son activité et de

réduire les effets secondaires. Dans ce contexte, les US apparaissent comme une technique à fort potentiel pour favoriser la délivrance de drogues. Les applications dans le domaine de la délivrance de drogues par US sont extrêmement nombreuses et font de plus en plus appel à des vecteurs pour cibler davantage les zones d'intérêt.

Hyperthermie modérée

L'absorption d'une onde ultrasonore par les tissus résulte en une augmentation de la température. Cette augmentation peut être très importante ou n'être que modeste. On parle d'hyperthermie modérée si la température augmente de 3-5°C. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la génération d'une hyperthermie modérée (42-43°C) par US. Associée à des agents cytotoxiques, l'hyperthermie modérée est déjà utilisée en clinique pour des patients atteints d'un cancer dans la zone péritonéale. Après avoir retiré toutes les lésions visibles du cancer, un bain de chimiothérapie est maintenu à 43°C pendant 2 heures (215). L'hyperthermie modérée permet également de rendre les cellules tumorales plus sensibles à la radiothérapie (216) en limitant les effets pour les cellules saines de l'organisme. En effet, les cellules tumorales et saines ne répondent pas de la même façon face à une augmentation de la température : les premières présentent plus de difficultés que les secondes à évacuer la chaleur, ceci étant dû à leur vascularisation compacte et désorganisée.

La réponse cellulaire face à une augmentation de la température est multiple. En plus d'affecter la fluidité membranaire, une hyperthermie peut induire des modifications dans l'organisation du cytosquelette pouvant résulter en une altération de la forme des cellules et/ou d'organites formés de membranes comme le réticulum endoplasmique. L'hyperthermie peut augmenter la taille des pores membranaires (217) et la perméabilité des cellules endothéliales (218, 219). La synthèse d'ADN ou d'ARN est diminuée lorsque les cellules sont chauffées entre 42°C et 45°C. Cependant, si la synthèse d'ARN redémarre rapidement après arrêt de l'hyperthermie, le blocage de la synthèse d'ADN demeure plus long (220). Des observations microscopiques de cellules soumises à une hyperthermie ont révélé des dommages de l'appareil mitotique lors de la phase M et des dommages chromosomiques lors de la phase S du cycle cellulaire (221). L'expression de protéines, les Heat Shock Protein (HSP) confère aux cellules une certaine tolérance envers l'augmentation de la température et les protège d'éventuels dommages. A des températures cependant plus élevées, l'expression des HSPs est inhibée ce qui entraîne la mort des cellules. L'effet d'une hyperthermie dépend de la température atteinte, de la durée d'application et du type cellulaire (222).

A l'échelle tissulaire, l'environnement tumoral se caractérise par une réduction du flux sanguin, une hypoxie, une acidose, la privation d'énergie ainsi qu'une pression intra-tumorale élevée. Une hyperthermie modérée peut augmenter le flux sanguin au sein des tumeurs et la perméabilité vasculaire (223). Après 30 minutes d'hyperthermie, le débit sanguin augmente ainsi entre 1,5 et 2 fois (224). L'augmentation du flux sanguin est corrélée à une augmentation de la saturation en oxygène, elle-même liée à l'hémoglobine des globules rouges. Ceci entraîne une augmentation de l'oxygénation des tumeurs (225). L'extravasation de molécules est également favorisée par l'augmentation de la perméabilité vasculaire (226) et peut durer pendant près de 6 heures après l'hyperthermie (217) qui affecte particulièrement les vaisseaux nouvellement formés (227, 228).

Il a été montré qu'une élévation modérée de la température induite par des US permettait non seulement de diminuer la pression intra-tumorale au sein d'une tumeur mais également d'y faciliter le passage de nanoparticules (229). Une augmentation de l'efficacité de drogues dites libres a été observée lorsqu'elles sont associées à des US. C'est le cas pour de nombreuses drogues utilisées en cancérologie notamment la doxorubicine dont l'efficacité est augmentée *in vitro* dans des fibroblastes (230). L'augmentation de la perméabilité transitoire des cellules sous l'effet des US est suggérée pour expliquer ces résultats. La même observation a été réalisée dans des cellules endothéliales cornéennes (231). Les auteurs soulignent une absence d'effet des US seuls sur la viabilité des cellules mais observent une nette accumulation de doxorubicine dans les cellules. L'élévation de la température occasionnée par les US a été évaluée : pour des intensités faibles (0.5 W/cm^2), la cytotoxicité de la doxorubicine est significativement augmentée lorsque la température approche les 43°C (232). A des intensités supérieures (1 W/cm^2), l'effet cytotoxique de la doxorubicine est triplé.

Effets non thermiques

L'augmentation de la délivrance de drogues ne repose pas uniquement sur une augmentation de la température. D'autres mécanismes sont impliqués : parmi eux, le passage d'une onde acoustique dans un fluide ou un tissu peut générer un mouvement appelé « acoustic streaming » susceptible d'augmenter le transport de molécules (233). De plus, la génération d'un phénomène de cavitation induit de fortes contraintes mécaniques aux tissus et aux particules environnantes. Ainsi, les applications de la cavitation consistent à fragmenter des nano-particules ou à ouvrir une barrière anatomique, comme la barrière hémato-encéphalique (234, 235). Utilisant ce principe, l'utilisation de vecteurs tels les micelles et

surtout les liposomes qui encapsulent des drogues hydrophobiques s'est largement répandue. La délivrance locale du composé est basée sur l'explosion de la membrane plasmique du vecteur sous l'effet de phénomènes de cavitation couplés à une éventuelle augmentation de la perméabilité des cellules cibles (**Figure 15**). Les applications sont très larges et englobent la délivrance de gènes (236, 237), de protéines (238) dans des tissus variés comme pour le cœur (239), les tissus tumoraux (240) ou encore le tissu foetal (241).

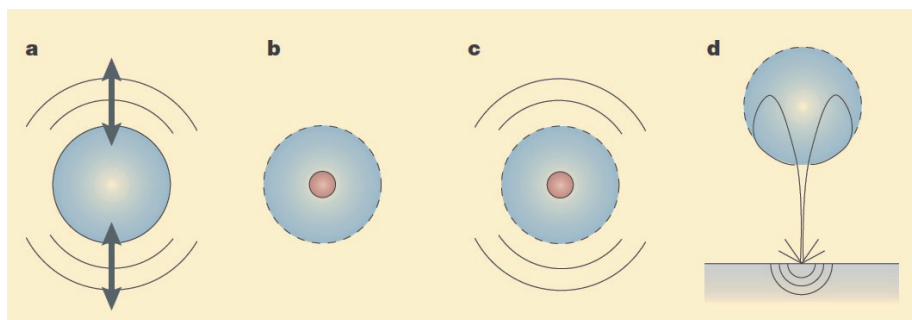


Figure 15 : Délivrance de drogue par cavitation

(A): Acoustic streaming : les bulles présentes dans le milieu, sous l'effet de la cavitation, oscillent et génèrent des forces de cisaillement sur les cellules et les tissus. (B) : l'explosion soudaine des bulles génère une élévation brutale de la température au centre la bulle. Ceci peut induire des changements chimiques dans le milieu alentour avec notamment la formation de radicaux libres. (C) : l'explosion des bulles peut engendrer des ondes de choc capables d'augmenter le transport de drogues et de faciliter la pénétration dans les tissus cibles. (D) : l'explosion de bulles près d'une surface peut avoir pour conséquence la formation de micro-jets qui peuvent à leur tour pénétrer dans un tissu et générer des ondes secondaires dans un tissu. Adapté de (242).

V) OBJECTIFS DE L'ETUDE

La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des métastases osseuses a énormément progressé. Malgré cela, elles demeurent une pathologie complexe face à laquelle les traitements n'apportent aucun bénéfice sur la survie. Le développement de nouvelles thérapies est donc essentiel.

La possibilité d'utiliser les LIPUS dans le traitement des métastases osseuses est apparue assez récemment et reste peu documentée (243). Il a été montré qu'ils n'induisaient pas la prolifération de cellules tumorales d'origine prostatique ou d'ostéosarcome mais qu'ils favorisaient la migration et la différenciation de cellules de la lignée ostéoblastique MC3T3-E1 (243). En stimulant les activités ostéoblastiques, les LIPUS pourraient dès lors contrecarrer le cercle vicieux des métastases osseuses et prévenir ainsi la destruction osseuse qui leur est associée. Les effets mécaniques mis en jeu lors de l'application des LIPUS pourraient également favoriser la pénétration de drogues dans des cellules tumorales.

Par ailleurs, la faible disponibilité des BPs réduit considérablement leur action. Ainsi, des études récentes ont porté sur l'augmentation de la délivrance de drogues en utilisant des

polymères tels la poly-L-lysine (244) ou le PLGA (poly (lactic-co-glycolic) acid) (245) afin d'augmenter l'effet antitumoral des BPs et leur internalisation. Le développement de liposomes thermosensibles, encapsulant la doxorubicine, ouvre également des possibilités pour l'association d'HIFU ce qui permet une libération ciblée et accrue de doxorubicine au niveau de la moelle osseuse (43°C) (246).

Mon travail de thèse s'inscrit dans le contexte de l'augmentation de la délivrance de BPs dans le traitement de métastases osseuses ostéolytiques. Nous avons associé des US de faible intensité à une dose clinique de BPs. Cette approche a été motivée par plusieurs points : d'une part, par la faible biodisponibilité des BPs pour les cellules tumorales due à la forte affinité de ces derniers pour l'hydroxyapatite ; d'autre part, par la démonstration d'effets antitumoraux des BPs *in vitro* et *in vivo* mais à des doses élevées, incompatibles avec un usage en clinique, en raison des potentielles complications rénales associées. Ce travail s'intéresse donc aux US capables d'induire des effets mécaniques et/ou thermiques, d'augmenter la disponibilité des BPs pour les cellules tumorales et d'en potentialiser les effets en assurant leur pénétration dans les tumeurs. Ces travaux, réalisés sur des cultures cellulaires mais également dans des modèles murins, sont décrits à travers les trois chapitres suivants et des annexes.

Le chapitre 2 du manuscrit décrit les sondes ultrasonores et l'instrumentation associée. L'effet des paramètres de traitement choisis sur la pénétration du BP a été évalué *in vitro* sur différents modèles cellulaires. Une étude sur les mécanismes cellulaires impliqués a été réalisée afin d'apporter une explication sur le rôle des US.

Le chapitre 3 de ce manuscrit s'intéresse dans un premier temps à l'effet d'US dans le traitement de métastases osseuses *in vivo*. L'acide zolédronique (ZOL) et des US de faible intensité ont été associés. L'efficacité de ce traitement a été évaluée sur un modèle murin de métastases osseuses, développé au laboratoire. Dans une seconde partie, l'utilisation *in vivo* d'un BP fluorescent a permis de suivre sa fixation à l'os sous l'effet des US. Enfin, un modèle murin de tumeur mammaire sous-cutanée a été utilisé afin d'évaluer l'effet des US et du ZOL sur une tumeur mammaire située à distance du site osseux.

Récemment, de nombreuses études font état d'un effet synergique entre les BPs et une chimiothérapie dans le traitement des tumeurs du sein. Le chapitre 4 se place dans ce contexte. Il est ainsi consacré à l'association d'US de faible intensité avec une chimiothérapie, la doxorubicine, et du ZOL. Cette association a été évaluée *in vitro* puis *in vivo*.

CHAPITRE 2

Instrumentation ultrasonore pour la délivrance de bisphosphonates *in vitro* par ultrasons

I) INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à la description de l'appareillage ultrasonore utilisé pour l'ensemble des manipulations décrites dans ce manuscrit. Les ultrasons (US) ont été émis de manière pulsée ou continue. Dans les deux cas, de faibles intensités ont été utilisées. Deux sondes ont été conçues selon le mode d'excitation et à des fréquences d'émission différentes (1.2 MHz en mode pulsé et 2.9 MHz en mode continu). Les ultrasons pulsés de faible intensité (LIPUS en anglais pour Low Intensity Pulsed Ultrasound) sont connus pour leur efficacité dans la consolidation de fractures (247). Ils permettent d'induire un stress mécanique dans les tissus biologiques, en particulier le milieu osseux, sans créer d'élévation de température. Les ultrasons de faible intensité délivrés de manière continue (C-US en anglais pour Continuous Ultrasound) ont été utilisés pour générer une hyperthermie modérée dans les tissus (de l'ordre de 43°C) en plus d'un stress mécanique inhérent à la nature de l'onde ultrasonore. La première partie de ce chapitre est consacrée à la description du matériel utilisé et à la calibration des deux sondes ultrasonores. La seconde partie de ce chapitre décrit l'intérêt des US de faible intensité délivrés de manière pulsée ou continue pour la délivrance d'un bisphosphonate (BP) dans des cellules tumorales mammaires. L'incidence des paramètres ultrasonores (intensité, durée d'émission par exemple) sur la pénétration du BP dans les cellules tumorales est décrite. Une étude préliminaire sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la pénétration du BP a également été menée et apporte les premiers éléments de réponse quant au rôle des US. Enfin, la pénétration du BP avec des C-US de faible intensité a été évaluée plus en détails sur la lignée cellulaire MDA-MB-231/B02, développée au laboratoire et utilisée par la suite, *in vivo*, comme modèle de métastases osseuses.

II) MATERIEL ET METHODES

A. Sondes ultrasonores

Deux sondes ont été utilisées au cours de ce projet. La première a été utilisée pour générer des ultrasons de faible intensité délivrés de manière continue (C-US). Son transducteur

fonctionne à la fréquence de 2.9 MHz. La seconde sonde a été dédiée à la génération d'ultrasons pulsés de faible intensité (LIPUS) avec un transducteur fonctionnant à la fréquence de 1.2 MHz. Les deux transducteurs sont des disques plans dont la surface active mesure 4 cm de diamètre (**Figure 16**). Une enveloppe en polyuréthane (CIV-Flex Transducer Cover; CIVCO, Kalona, Iowa, USA) a été installée autour du transducteur pour permettre la circulation d'un liquide dégazé (Ablasonic, Edap-TMS, Vaulx en Velin, France). Ce liquide assure le couplage acoustique avec la surface insonifiée. L'enveloppe a été maintenue immobile grâce à la mise en place d'un joint (SCMR, France) autour de la sonde. L'épaisseur de l'enveloppe entraîne une atténuation de la pression ultrasonore d'environ 2% à 2.9 MHz et 1% à 1.2 MHz. Une pompe péristaltique Masterflex (L/S modèle 7518-60, Cole-Parmer Instruments, Chicago, États-Unis) a permis la circulation d'un flux continu (0,3 L/min) de liquide et a assuré le refroidissement du transducteur pendant les phases d'émission afin d'éviter tout endommagement de celui-ci. Le refroidissement du liquide est assuré par un échangeur thermique plongé dans un bain réfrigérant à 20°C. Un thermocouple, situé sur la face arrière du transducteur, au niveau de la zone émettrice a permis le suivi de la température lors de l'utilisation de la sonde afin d'éviter tout endommagement.

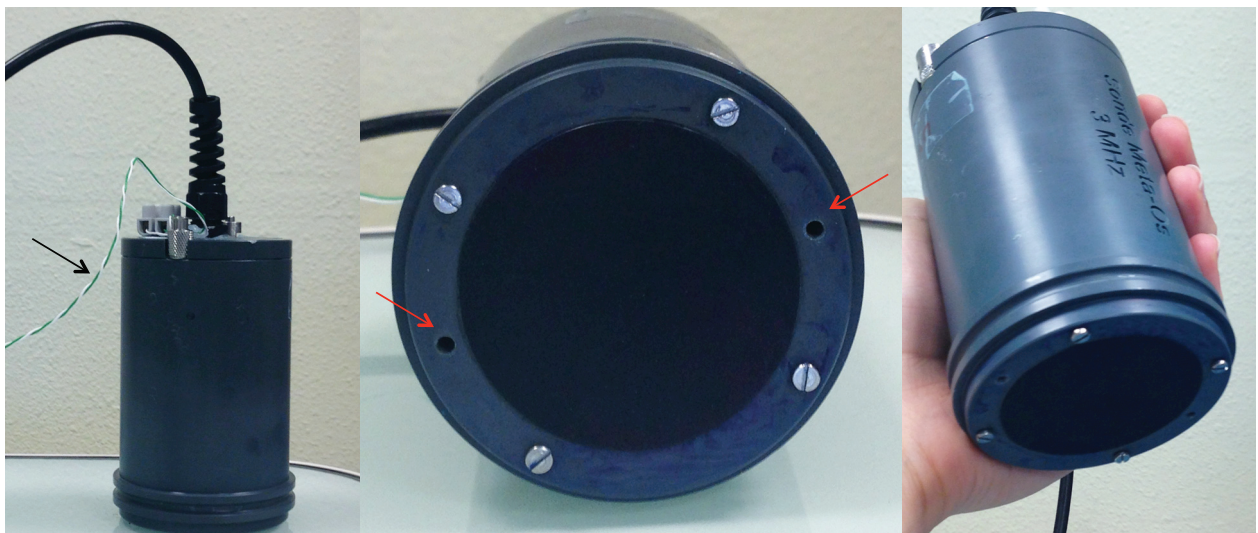


Figure 16 : Sonde ultrasonore

Les deux sondes ultrasonores utilisées pour générer des LIPUS ou des C-US sont similaires : l'émetteur ultrasonore est dans les deux cas un transducteur plan de 4 cm de diamètre. Un thermocouple, indiqué par la flèche noire (*image de gauche*), permet de suivre l'évolution de la température au cours des tirs ultrasonores. Les flèches rouges (*image au centre*) marquent les trous situés sur le boîtier, à côté du transducteur, et permettant le remplissage du ballonnet de protection avec du liquide dégazé.

B. Paramètres ultrasonores

Les US ont été délivrés de manière continue (C-US) ou pulsée (LIPUS). La durée du traitement ultrasonore découle de la volonté d'y associer du ZOL par la suite. Ainsi, puisque ce dernier circule dans le sang pendant approximativement 30 minutes à 1 heure, nous avons fixé la durée d'un traitement ultrasonore à 30 minutes.

Les paramètres pour les C-US ont d'abord été définis, chez la souris, après une série de simulations permettant d'induire et de maintenir une hyperthermie modérée tout en générant un stress mécanique. Ces paramètres permettent d'induire une augmentation de la température au niveau des tissus insonifiés jusqu'à 43°C en 6 minutes puis de la maintenir pendant les 24 minutes restantes. Dans ces conditions, l'amplitude de pression négative maximale a été évaluée à 0.29 MPa.

In vivo, la puissance acoustique a été appliquée de la façon suivante : 13W pendant 7 minutes, 10W pendant 2 minutes, 8W pendant 4 minutes, 9W pendant 2 minutes et enfin 8W pendant 15 minutes. Afin d'utiliser ces US *in vitro*, la puissance acoustique a été ajustée afin de tenir compte de l'absorption des tissus. Ainsi, nous avons raisonné que lorsque les C-US étaient délivrés chez la souris, les ondes ultrasonores étaient atténuées par environ 1 cm de tissus vivants (peau, muscles et graisses) avant d'atteindre l'os. *In vitro*, la sonde a été placée directement au contact du milieu de culture cellulaire. Afin de reproduire les conditions d'exposition utilisées *in vivo*, la puissance acoustique a été recalculée avec un coefficient d'absorption de 0.6 dB.cm⁻¹.MHz⁻¹. Les puissances acoustiques ont ainsi été recalculées et appliquées de la façon suivante : 9W pendant 7 minutes, 7W pendant 2 minutes, 5W pendant 4 minutes, 6W pendant 2 minutes et finalement 5W pendant 15 minutes.

Les effets mécaniques relatifs aux LIPUS ont été produits avec des ondes ultrasonores d'une fréquence de 1.2 MHz. La durée de l'impulsion a été de 200 µs, le temps de pause entre les impulsions a été de 800 µs. L'intensité acoustique a été de 40 mW/cm² (Spatial Average, Temporal Average). Ces paramètres correspondent à ceux déjà utilisés en clinique, dans le cadre de l'accélération de la consolidation osseuse après une fracture (197).

C. Matériel ultrasonore

Chaque sonde ultrasonore est associée à un ensemble d'appareils. Le matériel ultrasonore se compose d'un générateur de fonction qui crée un signal sinusoïdal d'amplitude et de fréquence variable. Le signal sinusoïdal a été amplifié par un amplificateur de courant (Kalmus modèle 150 CF, Engineering International, Woodinville, WA), relié à un wattmètre (Hewlett Packard GmbH, Boblinger, Germany). La sonde ultrasonore a été reliée au

wattmètre (Rohde & Schwarz, Munich, Germany) via une tête de mesure (NAP-Z7, Rohde & Schwarz, Munich, Germany) ce qui a permis le suivi et l'enregistrement des puissances acoustiques émises et réfléchies. Elle permet la conversion d'un signal électrique en un signal acoustique, *via* le transducteur. La température du transducteur a été suivie au moyen d'un thermocouple collé sur la face arrière des transducteurs et connectés à une interface USB (TC-08, Pico Technology, UK) de manière à prévenir toute surchauffe du transducteur.

D. Mesures des performances acoustiques

Cette étude a été conduite afin de mesurer le rendement électroacoustique et la puissance ultrasonore émise en fonction respectivement de la fréquence du signal d'excitation et de la puissance électrique appliquée sur le transducteur ultrasonore. La méthode employée a été celle de la balance acoustique (248). Brièvement, la sonde a été immergée dans un cristalliseur d'eau dégazée dans lequel un absorbant a été préalablement posé. Le cristalliseur est positionné sur une balance. La sonde est placée de manière parallèle à l'absorbant et le plus près possible de celui-ci pour diminuer au maximum les éventuelles pertes dues à la divergence du faisceau ultrasonore (**Figure 17**). Une attention particulière a été portée à l'absence de bulles sur le transducteur ce qui induirait des mesures erronées et l'endommagement du transducteur.

Des insonifications rapides de 3 secondes ont été lancées. Le transfert de quantité de mouvement entre le faisceau ultrasonore et la cible absorbante qui reçoit ce dernier a été mesuré. L'absorbant étant placé sur le plateau d'une balance, la force se traduit par une variation de la masse, directement proportionnelle à la puissance acoustique émise par la sonde. Etant donné le faible coefficient d'atténuation de l'eau, la puissance acoustique mesurée sur la balance est identique à celle générée à la surface du transducteur.

Les mesures ont été réalisées avec des temps d'émission courts pour éviter une élévation de température du transducteur et une modification conséquente de la poussée d'Archimède à cause de la dilatation de l'absorbant. Des mesures préliminaires ont permis de démontrer que l'impédance acoustique de l'absorbant utilisé était proche de celle de l'eau (1,4 MRayleigh).

Le rendement de la sonde représente la conversion de l'énergie électrique en énergie acoustique et se déduit par le rapport de la puissance acoustique mesurée par la balance rapportée à la puissance électrique mesurée par le wattmètre. La puissance acoustique (en watts) est ensuite mesurée en fonction de la puissance électrique transmise pour la fréquence de rendement optimal.

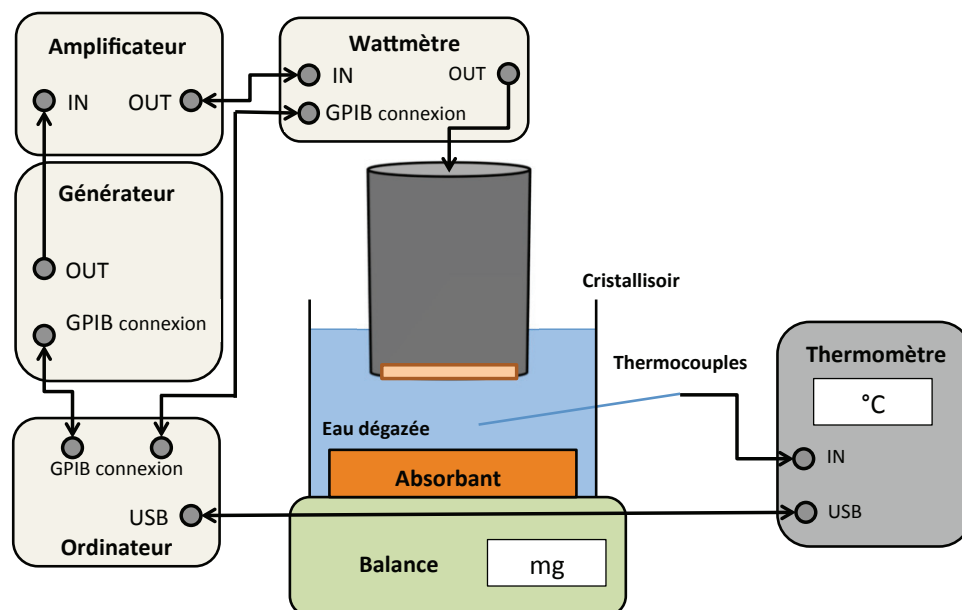


Figure 17 : Mesure du rendement et de la puissance acoustique

Un absorbant est placé dans un cristalliseur rempli d'eau dégazée. L'ensemble est déposé sur une balance. La sonde ultrasonore est placée dans l'eau dégazée, parallèlement à l'absorbant. Le transducteur est représenté par un rectangle orange au niveau de la sonde ultrasonore. Les variations de masse directement proportionnelles à la pression de radiation sont mesurées par la balance, pendant les tirs qui durent 3 secondes.

E. Mesure de la température induite *in vitro* et *in vivo* par les ultrasons

Des essais ont été conduits *in vitro* sur des foies de génisse puis sur des cadavres de souris. Le but était de déterminer les paramètres ultrasonores permettant de générer et de maintenir une hyperthermie modérée (43°C) au niveau de l'interface os-tissus dans les pattes arrière des animaux. De la même façon, il a été vérifié que les paramètres utilisés pour l'application des LIPUS n'engendraient pas d'augmentation de la température. Le ballonnet enveloppant la sonde a été rempli de liquide de couplage (Ablasonic, EDAP-TMS, Vaux-en-Velin) et le système de refroidissement a été mis en place. Un thermocouple (0,33 mm de diamètre, MT-29, Physitemp, NJ, USA) a été introduit dans le muscle d'une des pattes postérieures au niveau de l'interface avec l'os. Un thermocouple identique a été placé dans la zone abdominale. Ces deux thermocouples ont été connectés à des thermomètres reliés à une interface USB (TC-08, Pico Technology, UK) de manière à suivre l'évolution de la température au cours du temps. Les valeurs de température ont été notées toutes les minutes, pendant les 30 minutes de traitement. Une fois les paramètres ultrasonores validés, cette même expérience a été reproduite *in vivo* sur des souris anesthésiées par voie gazeuse de la même façon que précédemment (**Figure 18**) dans le cadre d'un protocole d'expérimentation approuvé par le comité d'éthique de l'Université de Lyon (n°BH2010-45).

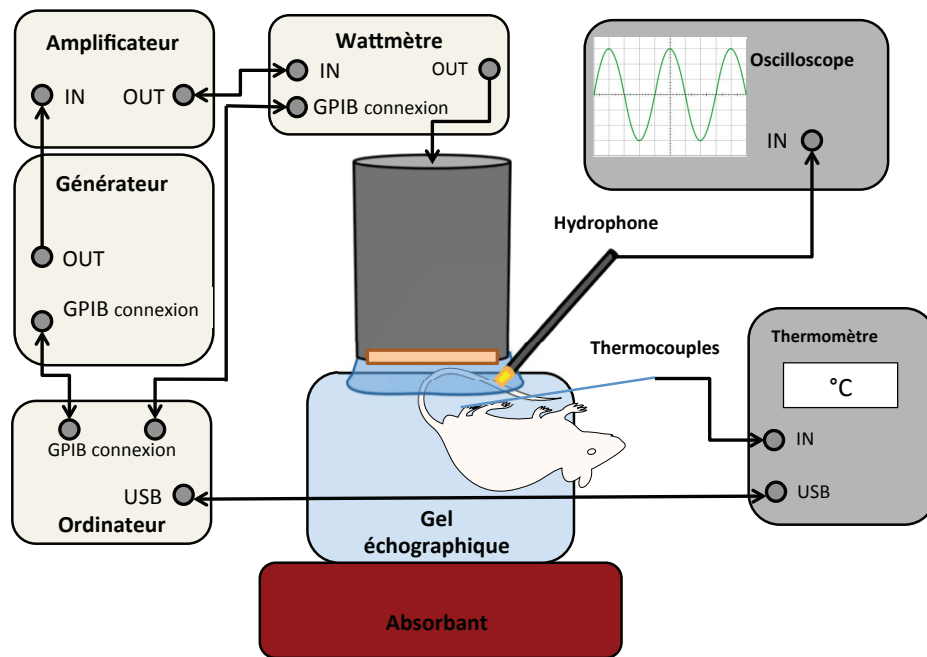


Figure 18 : Mesure de la température *in vivo*

La souris a été anesthésiée par voie gazeuse pendant 30 minutes. Elle est placée sur un absorbant recouvert de gel échographique. Les pattes de la souris ainsi que la partie basse de son abdomen sont recouvertes de gel échographique. La sonde, enveloppée d'une protection stérile remplie de liquide dégazé, est positionnée au contact direct du gel échographique recouvrant la souris. Elle est placée au-dessus des pattes postérieures de l'animal. Un thermocouple est inséré dans l'une des pattes postérieures de l'animal, au niveau de l'interface entre l'os et les tissus avoisinants. Un autre thermocouple est inséré dans la cavité abdominale. Un hydrophone est relié à un oscilloscope afin d'évaluer l'activité de cavitation. Le transducteur est représenté par un rectangle orange au niveau de la sonde ultrasonore. Sa température est mesurée pendant le traitement et ne dépasse pas 20°C.

Enfin, ces mesures ont été effectuées *in vitro*, dans des boîtes de Pétri (**Figure 19**). La sonde, enveloppée dans le ballonnet stérile rempli de liquide dégazé, a été immergée directement dans le milieu de culture. Un thermocouple a été placé directement dans le milieu de culture, sous le transducteur. Afin d'induire une hyperthermie *in vitro*, semblable à celle observée *in vivo*, les boîtes de Pétri ont été plongées dans un bain chauffé et maintenu à 37°C pendant la durée de l'expérience.

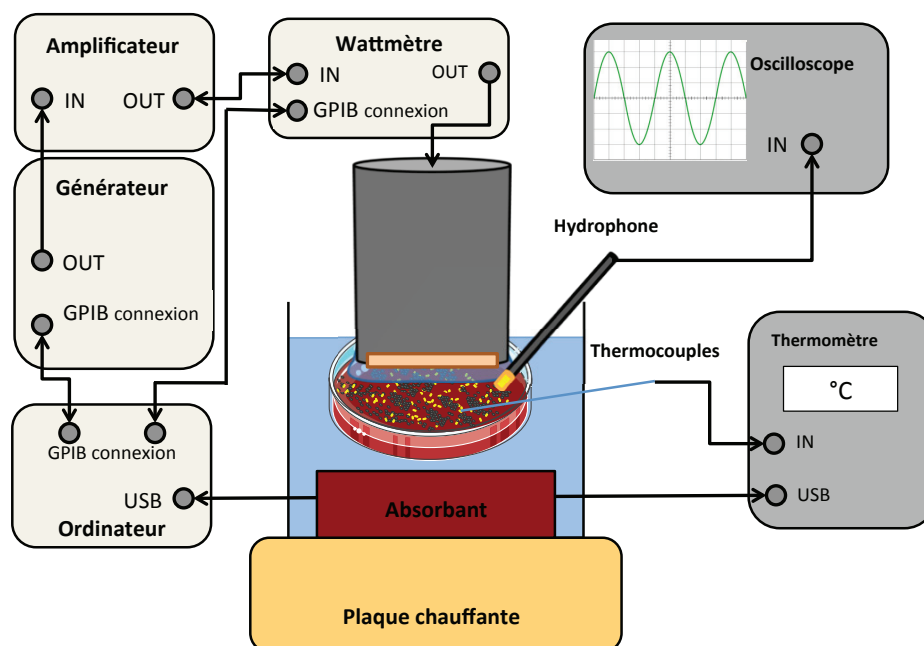


Figure 19 : Traitement ultrasonore *in vitro*.

La boîte de Pétri est immergée dans un bain à 37°C et posée sur un absorbant. L'ensemble est placé sur une plaque chauffante. La sonde, enveloppée d'une protection stérile et remplie de liquide dégazé est posée directement au contact du milieu contenant le ZOL. Un hydrophone est relié à un oscilloscope afin d'évaluer l'activité de cavitation. Le transducteur est représenté par un rectangle orange au niveau de la sonde ultrasonore.

F. Mesures de cavitation

L'activité de cavitation a été mesurée en utilisant un hydrophone (ONDA-HNR-1000, Sunnyvale, CA) (**Figure 18 & Figure 19**). Pour évaluer l'activité de cavitation, deux caractéristiques ont été recherchées : le signal diffusé par l'implosion de bulles de cavitation est un signal de large bande spectrale synonyme de cavitation inertielle, par opposition aux oscillations stables en régime de cavitation stable, qui diffusent une onde dont le contenu spectral se compose d'harmoniques et des sous-harmoniques du signal d'excitation. L'hydrophone a été placé à proximité de la cible et en direction du milieu traité sans être dans le champ ultrasonore de la sonde induisant l'effet thérapeutique. Le signal capté par l'hydrophone a été enregistré sur un oscilloscope (Wavejet 324, LeCroy, NY, USA) puis analysé avec un logiciel développé au laboratoire sous Matlab®.

III) MATERIEL ET METHODES

A. Lignées cellulaires

Toutes les lignées cellulaires eucaryotes MCF-7 et MDA-MB-231 (ATCC, Molsheim, France) ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂. La sous-population MDA-MB-231/B02 a été générée dans notre laboratoire, suite aux passages

répétés *in vivo* dans l'os des cellules MDA-MB-231 injectées par voie intra-cardiaque (249). Ces deux lignées sont issues de carcinome mammaire épithélial. Les cellules MDA-MB-231/B02 et MCF-7 ont été respectivement cultivées dans du milieu DMEM (Invitrogen, Carlsbad) et MEM (Invitrogen). Chacun des milieux utilisés a été supplémenté en sérum de veau fœtal (10%, SVF, Lonza, Bâle, Suisse) et en antibiotiques (1%, pénicilline et streptomycine, GE Healthcare, France). Un ajout en insuline (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) à la concentration de 10 µg/mL a été effectué pour le milieu MEM.

B. Bisphosphonate

Dans cette étude, nous avons utilisé l'acide zolédronique (ZOL) à la concentration de 25 µM (150) ce qui correspond approximativement à la quantité de ZOL présente au sein de la moelle osseuse après une injection chez un patient (entre 20 et 100 µM) (250). Cette dose n'induit pas d'effet sur la prolifération des cellules lorsque les temps d'incubation sont courts (en-deçà de 48 heures). Le BP, resuspendu dans du PBS (Life Technologies) a été filtré et stocké à -20°C jusqu'à son utilisation. Pour les manipulations, il a été dilué dans le milieu de culture.

C. Synopsis

Les expérimentations se sont déroulées en 3 jours. Le premier (J0), un million de cellules (MDA-MB-231/B02 et MCF-7) ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Un cercle, de la taille du transducteur, a été tracé à l'extérieur de la boîte afin de marquer l'emplacement de la sonde. Ceci a permis, par la suite, de ne tenir compte que des cellules qui auront été placées sous le transducteur. Les boîtes du groupe témoin, ne recevant aucun traitement ultrasonore, ont été traitées de la même façon en tout point hormis le traitement ultrasonore. Le deuxième jour (J1), les cellules ont été lavées au PBS (Life Technologies) et les cellules situées à l'extérieur du cercle ont été décollées au moyen d'un râtelier stérile. Les cellules adhérentes ont été traitées avec du ZOL (25 µM) pendant 1 heure ou 18 heures. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 17h à 37° sous 5% de CO₂ jusqu'à J3.

Dans une première partie, les US (pulsés ou continus ; LIPUS ou C-US) ont été combinés à un traitement au ZOL. Les cellules ont également été traitées au ZOL en combinaison avec une hyperthermie produite par un bain chaud à 43°C (HT). Dans une deuxième partie, les cellules ont d'abord été traitées aux US (C-US ou LIPUS) ou par HT et ont ensuite été

traitées au ZOL pendant 18 heures. Les cellules traitées avec du PBS (Témoin) ou uniquement avec du ZOL ont été utilisées comme outil de comparaison (**Figure 20**).



Figure 20 : Synopsis des traitements *in vitro*

D. Traitements ultrasonores

Le temps de traitement ultrasonore a été fixé à 30 minutes en vue des futurs essais *in vivo* car après son injection, le ZOL circule dans le sang entre 30 minutes et 1 heure avant d'être minéralisé dans l'os (251). Les boîtes de Pétri ont été placées sur un absorbant ultrasonore immergé dans un bain maintenu à 37°C. Les sondes ont été enveloppées dans une protection stérile (CIVCO, Kalona) remplie de liquide Ablasonic (EDAP-TMS, Vaulx-en-Velin). Le liquide de couplage a été maintenu à température ambiante. Afin d'éviter le décollement des cellules, la circulation de ce liquide a été stoppée pendant les traitements *in vitro*. La sonde a ensuite été placée au contact du milieu de culture contenant, ou non, du ZOL, de façon à être alignée avec le cercle préalablement tracé. Pendant les traitements, les puissances acoustiques émises et reçues ont été suivies ainsi que la température de la sonde ultrasonore. Les deux sondes générant respectivement des LIPUS et des C-US, ont été placées côte-à-côte et ont fonctionné indépendamment l'une de l'autre pendant 30 minutes.

A l'issue du traitement, les cellules ont été replacées à 37°C en atmosphère humide. Les boîtes appartenant au groupe témoin, ne recevant pas d'US, ont été maintenues dans l'incubateur à 37°C.

E. Traitements hyperthermiques

Les traitements par US induisent un stress mécanique sur les cellules ainsi qu'une élévation de température. Afin d'évaluer l'effet d'une hyperthermie seule (HT), les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri à la concentration d'un million de cellules par boîte avant d'être placées à l'incubateur jusqu'au lendemain. Les cellules ont ensuite reçu un traitement au BP pendant 1 heure ou 18 heures dans un bain préalablement chauffé à 43°C

avant le début de l'expérience. La température a été maintenue à 43°C pendant 30 minutes. Les cellules ont été placées à l'incubateur à l'issue de ces traitements.

F. Prolifération des cellules

Après traitement, les cellules ont été conservées pendant 18 heures à l'incubateur. Elles ont été lavées au PBS, décollées par un traitement à la trypsine (Invitrogen) et un aliquot a été prélevé. Les cellules ont été mises en présence de bleu trypan afin de différencier les cellules vivantes des cellules mortes et comptées sous le microscope.

G. Viabilité des cellules

L'intégrité membranaire des cellules a été attestée par cytométrie de flux immédiatement à la fin des traitements (US ou HT) ou 18 heures après. Les cellules ont été décollées et re-suspendues à la concentration de 5×10^5 cellules dans 200 μ L de PBS. Puis, 10 μ L de solution de 7-Aminoactinomycine-D (7-AAD, BD Biosciences) ont été ajoutés. Le 7-AAD a la propriété de s'intercaler entre les brins d'ADN et est utilisé comme un marqueur de viabilité cellulaire : ainsi seules les cellules dont la membrane plasmique est altérée ont été marquées. Après une incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière, les cellules ont été analysées en cytométrie de flux (FACs Canto II, BD Biosciences). Les résultats ont été compilés sur le logiciel associé FACSDiva (BD Biosciences).

H. Extraction et dosage de l'IPP et de l'ApppI

Le ZOL est un inhibiteur de la farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS), une enzyme de la voie du mévalonate. Cette inhibition entraîne une inhibition de la prénylation des petites protéines G ce qui altère la signalisation cellulaire et entraîne l'apoptose des cellules. L'inhibition de la FPPS génère l'accumulation d'un intermédiaire, l'IPP, qui s'associe avec de l'AMP et forme un facteur cytotoxique, l'ApppI (97). L'accumulation d'IPP et d'ApppI a été mesurée chez la lignée MCF-7 comme décrit précédemment (252). Ces deux métabolites sont considérés comme des marqueurs de la pénétration du ZOL. Leur accumulation est reliée au temps d'incubation du ZOL (150). Les cellules tumorales ont été décollées et lavées au PBS (Life Technologies). La suspension a été centrifugée durant 5 minutes (1000 rpm, 24°C). Le culot cellulaire a été mis en présence d'un mélange composé de 60% d'acétonitrile (VWR) et de 40% d'eau glacée. Les échantillons ont été homogénéisés et centrifugés à 14000 rpm pendant 3 minutes à 4°C. Le culot cellulaire a été conservé pour le dosage de protéines, le surnageant a été collecté pour le dosage de l'IPP et de l'ApppI. Les surnageants ont été

évaporés puis reconstitués avec 100 µl de tampon hexylamine avec 0,25 mM de fluorure de sodium (NaF) et d'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) et 1 µM de méthylèneadenosine 5'-triphosphate (AppCp) comme standard interne. En tout, 40 µl de chaque échantillon ont été injectés dans le système HPLC. L'analyse a été réalisée sur un spectromètre Waters Micromass® ZQ™ Single Quadrupole Mass, couplé au logiciel Empower2 (Waters Corp. Milford, MA, USA). Une colonne Nucleodur® C18 Pyramid, 3µm, 4.6 x125 mm (Macherey-Nagel, Düren, Germany) a été utilisée pour séparer les métabolites de la voie du mévalonate. Le standard interne pour l'IPP a été fourni par Sigma-Aldrich. Le standard interne pour l'ApppI a été fourni par le Dr Eric Champagne. Le dosage de protéines associé a été réalisé en utilisant la méthode de Bradford. Le réactif de Bradford a été fourni par Sigma-Aldrich. Les résultats sont ainsi présentés sous la forme d'un ratio entre l'accumulation d'IPP ou d'ApppI (en pmol) et la quantité de protéines correspondante (en mg).

I. Western Blot

L'accumulation intracellulaire de Rap1A, sous sa forme totale et non prénylée, a été évaluée par Western Blot. Pour cela, les cellules ont été lavées au PBS et décollées à 4°C avec un râtelier stérile. Elles ont été lysées dans un tampon RIPA (Sigma-Aldrich) contenant des inhibiteurs de protéases (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% Triton 100X, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine, Sigma-Aldrich). 50 µg de protéines ont été déposés sur des gels SDS-polyacrylamide 4-12% (Life Technologies). Les protéines ont finalement été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (Merck Millipore) par transfert semi-sec (1 mA.cm⁻²). Les membranes ont ensuite été saturées dans un tampon d'incubation TBS-Tween 20 (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 0.1%) supplémenté avec du lait écrémé 5% (p/v). Puis, les membranes ont été incubées la nuit, à 4°C, avec un anticorps polyclonal anti-Rap1A (dilution : 1/500 ; SantaCruz Biotechnology), un anticorps monoclonal anti-β-tubuline (dilution : 1/2000 ; Sigma-Aldrich). Les membranes ont été lavées puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP ; dilution : 1/2000, SantaCruz Biotechnology). Après lavage des membranes, la présence des protéines a été révélée grâce à un kit de chimioluminescence (ECL, Perkin Elmer LAS Inc.).

J. Microscopie électronique à transmission

1. Ultrastructure

A la fin du traitement ultrasonore, les cellules ont été fixées avec du glutaraldéhyde (2%) pendant 2 heures à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées dans un mélange de saccharose et

de cacodylate pendant 1 heure à 4°C et fixées dans du tétroxyde d'osmium (2%) mélangé à du cacodylate (EMS, France). Après déshydratation, les cellules ont été incluses dans une résine, composée d'Epon A et d'Epon B (v/v) ainsi que du DMP30 (1.7%) (EMS, France). Après 72 heures de polymérisation, des coupes fines ont été réalisées (environ 70 nm d'épaisseur) en utilisant un ultra-microtome (Reichert Ultracut E, Leica). Les coupes ont été observées au microscope électronique à transmission (Jeol 1400JEM, Tokyo, Japan) équipé d'une caméra (Orius 600). Le nombre de vésicules d'endocytose a été comptabilisé sur 25 cellules par groupe. Une vésicule d'endocytose se caractérise par sa taille d'environ 100 nm. Elles sont recouvertes d'un feutrage épais d'environ 15 nm de diamètre.

2. Immunomarquage

Les cellules ont été fixées pendant 2 heures dans un tampon contenant 10 mM de metaperiodate, 75 mM de lysine et 2% de paraformaldéhyde dilués dans du tampon phosphate Sorensen (37 mM et 0.2% glutaraldéhyde). Les cellules ont été lavées, déshydratées puis récupérées dans de l'éthanol. Elles ont ensuite été incluses dans une résine (London Resin White, LRWhite, EMS, France) et laissées à l'incubation pendant 48 heures pour polymérisation. Les sites non spécifiques ont été bloqués par un mélange de 1% de BSA (bovine serum albumine) et 1% de sérum de chèvre dans 50 mM de tampon Tris-HCl. L'immunomarquage a été réalisé sur la nuit, à 4°C, en chambre humide, en utilisant un anticorps murin anti-clathrine (1/500) dans 1% de BSA. Après lavage, l'anticorps secondaire chèvre anti-souris (Tebubio), couplé à des billes d'or de 10 nm, a été incubé pendant 45 minutes à température ambiante. L'immunocomplexe a été fixé au glutaraldéhyde 4% pendant 3 minutes. Les coupes ont été observées au microscope électronique à transmission (Jeol 1400 JEM, Tokyo, Japan) équipé d'une caméra (Orius 600). L'ensemble des manipulations relatives au microscope électronique à transmission a été réalisé au Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE).

K. Test statistique

Les résultats ont été analysés grâce au logiciel GraphPad Prism. Le test ANOVA à un seul facteur suivi d'une correction de Tukey a été utilisé pour comparer les différents groupes ensemble. La valeur de α a été fixée à 0.05 avec une puissance de 80%. Tous les tests réalisés pour ces expérimentations sont bilatéraux.

IV) RESULTATS

A. Calibration des sondes ultrasonores

Le rendement électroacoustique de l'ensemble câble - transducteur a été mesuré en fonction de la fréquence pour déterminer la fréquence de fonctionnement optimal des sondes utilisées. La plus grande valeur de rendement électroacoustique est de 84 % pour la sonde utilisée pour les C-US (**Figure 21-A**). Le rendement le plus élevé pour la sonde utilisée pour les LIPUS vaut 83% (**Figure 21-C**). Pour ces fréquences optimales, ces essais ont également permis de déterminer la puissance électrique à appliquer pour générer la puissance acoustique utile aux effets recherchés (**Figure 21-B & D**).

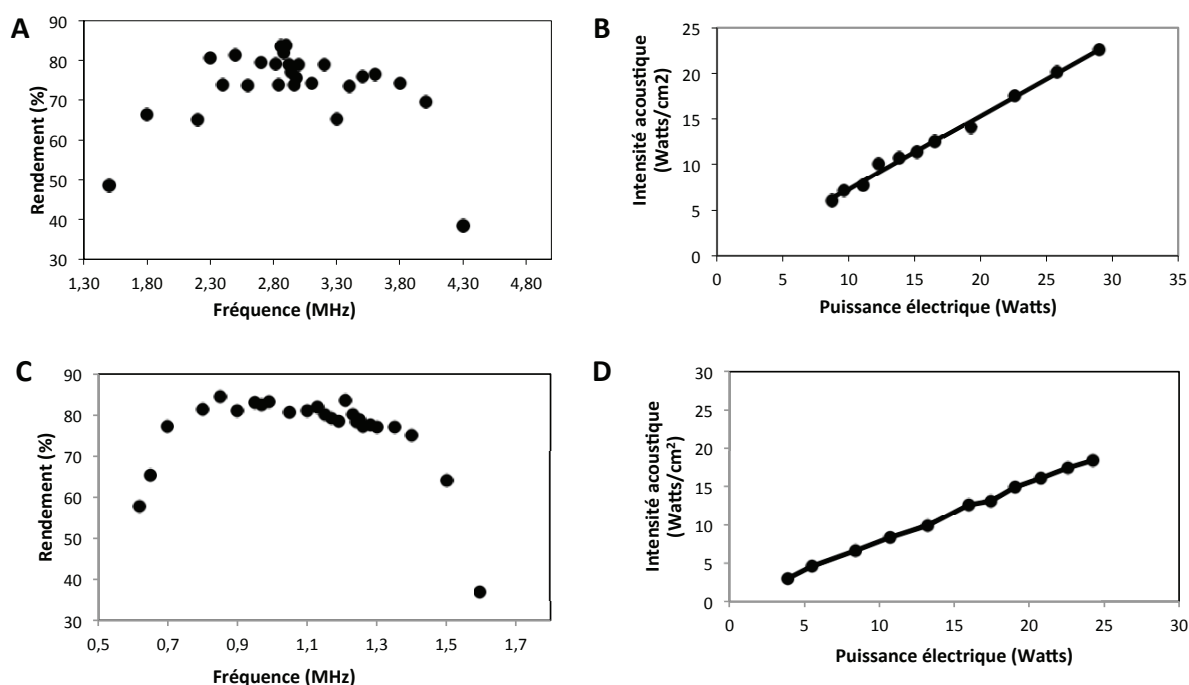


Figure 21 : Mesures de rendements et de puissances des deux sondes ultrasonores

Les mesures de rendement et de puissance ont été effectuées selon la technique de la balance acoustique. (A) Mesures du rendement de l'applicateur ultrasonore (en %) en fonction de la fréquence (MHz) pour la sonde générant des C-US. (B) Puissance acoustique (en Watts/cm²) en fonction de la puissance transmise à l'émetteur (en Watts) pour la sonde générant des C-US. (C) Mesures du rendement de l'applicateur ultrasonore (en %) en fonction de la fréquence (MHz) pour la sonde générant des LIPUS. (D) Puissance acoustique (en Watts/cm²) en fonction de la puissance transmise à l'émetteur (en Watts) pour la sonde générant des LIPUS.

B. Mesures de température et cavitation

In vivo, le traitement C-US permet d'induire et de contrôler une hyperthermie d'environ 43°C au niveau des pattes postérieures (**Figure 22-A**). La température augmente rapidement, en 6 minutes, pour atteindre 43°C et se stabilise ensuite pendant les 24 minutes restantes à cette température. La température au niveau de la cavité abdominale reste stable

suggérant que l'élévation de la température demeure localisée à la zone située sous le transducteur. Ainsi, le système de refroidissement de la sonde et l'eau froide qui y circule permettent de prévenir toute brûlure cutanée ainsi que d'éventuels dommages aux organes. La température initiale pour tout traitement *in vitro* est de 37°C. Afin de tenir compte de l'absorption des tissus *in vivo*, les paramètres ultrasonores ont été adaptés *in vitro*. Ainsi, lorsque ces paramètres ultrasonores ont été appliqués dans du milieu de culture cellulaire, une augmentation de la température d'environ 6°C a été notée (**Figure 22-A**). La température mesurée dans des boîtes de Pétri dans un bain chaud (HT) augmente de manière similaire à celle notée pendant un traitement C-US (**Figure 22-A**). Aucune augmentation de la température n'a été notée pour les LIPUS, que ce soit chez des souris ou dans des cultures cellulaires (**Figure 22-B**).

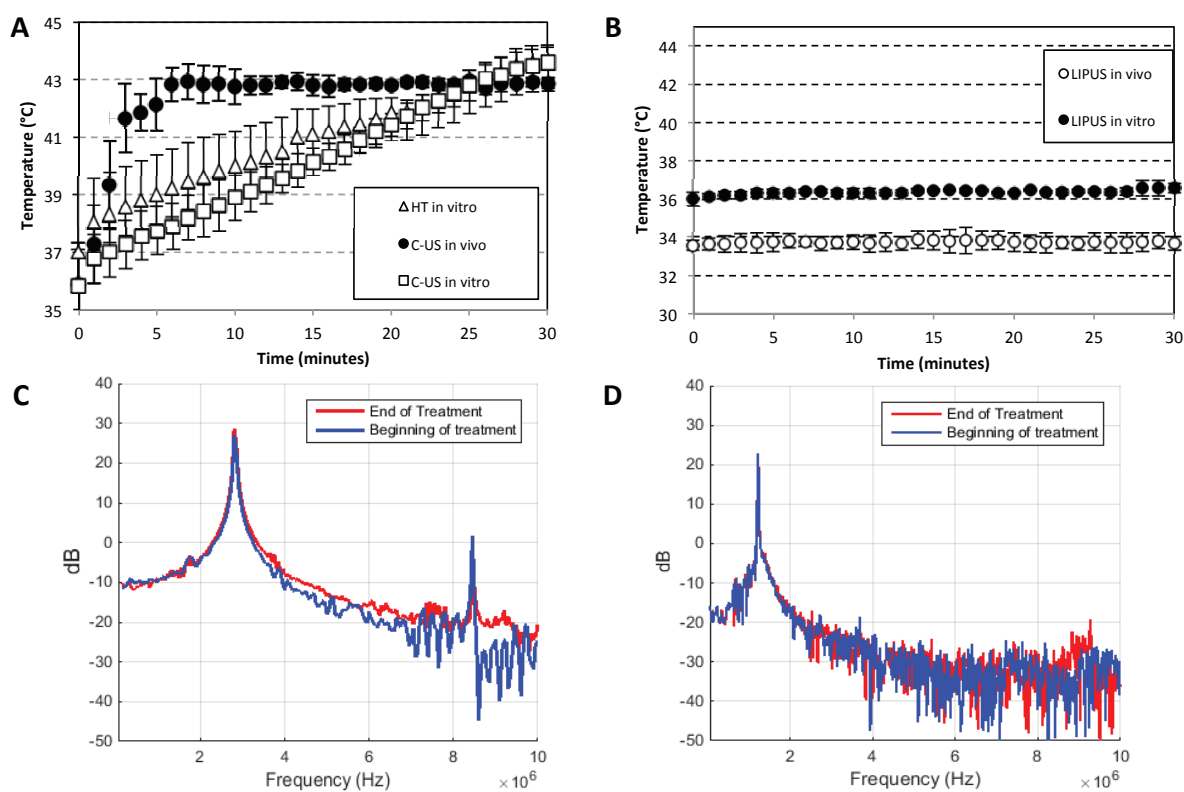


Figure 22 : Evolution de la température et évaluation de la cavitation *in vitro* et *in vivo*

(A) Mesures de la température réalisées chez des souris Balb c nude ainsi que dans des boîtes de Pétri sous l'effet de C-US. Les mesures réalisées dans des flasques immergées dans un bain chaud (43°C) sont également présentées. (B) Mesures de la température chez des souris Balb c nude ainsi que dans des boîtes de Pétri sous l'effet de LIPUS. (C) Mesures de cavitation dans des cultures cellulaires traitées aux C-US réalisées au début (ligne bleue) et à la fin (ligne rouge) du traitement ultrasonore. (D) Mesures de cavitation dans des cultures cellulaires traitées aux LIPUS au début (ligne bleue) et à la fin (ligne rouge) du traitement ultrasonore.

Afin d'attester si des phénomènes de cavitation étaient mis en jeu, deux critères ont été évalués : l'émission large bande, considérée comme une signature de la cavitation inertielle et

l'émission d'harmoniques de la fréquence fondamentale ($\frac{1}{2} f_0$, $\frac{3}{2} f_0$,...), qui sont des marqueurs des oscillations des bulles de cavitation stable lors des cycles acoustiques. Aucun de ces critères n'a été observé lorsque les traitements C-US ou LIPUS sont appliqués. Seules des harmoniques 3 liées au transducteur ont été mesurées (**Figure 22-C&D**).

C. Influence de la puissance acoustique sur la pénétration de ZOL

Dans un premier temps, les cellules MCF-7 ont été traitées avec du ZOL et des C-US dont la puissance acoustique a été de 9W, 7W ou 5W et ce, pendant une durée de respectivement 7 minutes, 2 minutes et 15 minutes. Les mesures de température réalisées pour ces trois conditions montrent des augmentations modérées de la température ($<5^{\circ}\text{C}$) pour 5 et 7 watts acoustiques et une augmentation de l'ordre de 8°C pour une puissance acoustique de 9W (**Figure 23-A**). L'accumulation d'IPP est plus importante chez les cellules ayant été traitées avec du ZOL et une puissance acoustique de 5W pendant 15 minutes (**Figure 23-B**). Cependant, compte tenu des variations dans les temps de traitement, la manipulation a été réitérée en traitant les cellules pendant 15 minutes pour toutes les puissances acoustiques (9W, 7W et 5W). Dans ces conditions, les cellules présentent la meilleure accumulation d'IPP en ayant été traitées avec du ZOL et des C-US dont la puissance acoustique est de 9W (**Figure 23-C**). Ainsi, une élévation de la puissance acoustique conduit à une meilleure accumulation de l'IPP, sans affecter la prolifération tumorale, évaluée 18 heures après le début des traitements (**Figure 23-D**). La durée des traitements et la puissance acoustique sont ainsi deux paramètres pouvant influencer la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales.

Dans un second temps, nous avons augmenté la puissance acoustique (11W, 13W et 18W) en conservant un temps d'insonification de 15 minutes. Comme attendu, l'augmentation de la température du milieu de culture est plus élevée notamment avec les puissances 13W et 18W (entre 10°C - 12°C) (**Figure 23-A**). L'accumulation d'IPP atteint un plateau (autour de 1000 pmol/mg) pour des puissances acoustiques se situant entre 11 et 18 W. Ainsi, l'augmentation de puissance acoustique au-delà des valeurs prédéfinies pour la séquence de traitement n'induit pas une meilleure augmentation de l'accumulation d'IPP et donc de la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales. Le nombre de cellules comptabilisé 18 heures après la fin des traitements ultrasonores ne montre pas de différence entre les groupes, en présence de ZOL et pour des valeurs de puissances acoustiques plus élevées (**Figure 23-D**).

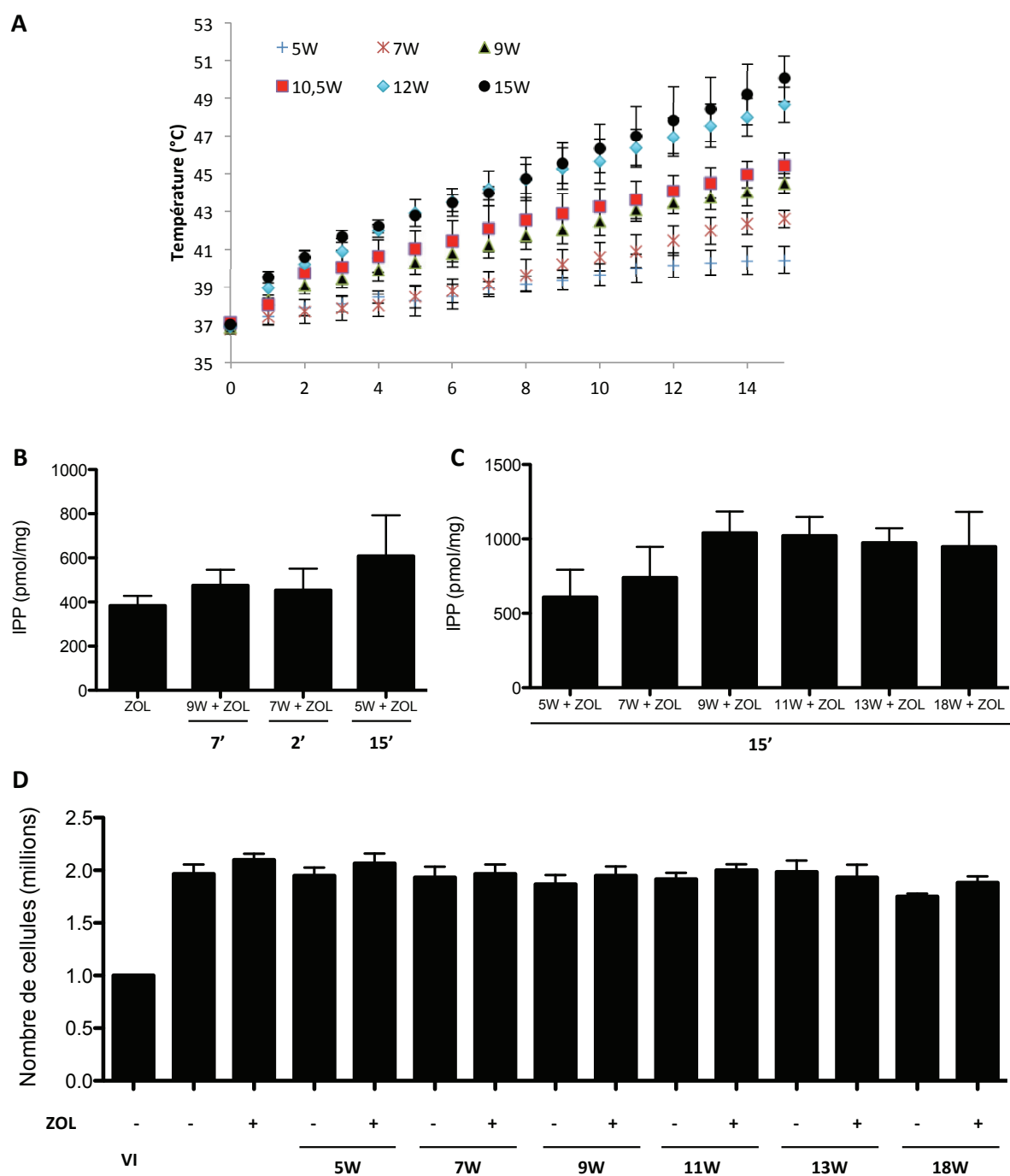


Figure 23 : Influence de la puissance acoustique sur la pénétration de ZOL

(A) Mesure de la température pour des puissances acoustiques de 5W, 7W, 9W, 11W, 13W et 18W appliqués pendant 15 minutes. Les boîtes de Pétri sont immergées dans un bain à 37°C au début de l'expérience. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (B) Accumulation d'IPP par spectrométrie de masse selon la séquence C-US. Les cellules MCF-7 sont traitées avec du ZOL pendant 18 heures en combinaison avec des C-US dont la puissance est de 9W, 7W ou 5W. Ces traitements US durent respectivement 7 minutes, 2 minutes et 15 minutes. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (C) Accumulation d'IPP par spectrométrie de masse. Les cellules MCF-7 sont traitées avec du ZOL pendant 18 heures en combinaison avec des C-US dont la puissance est de 5W, 7W, 9W, 11W, 13W et 18W pendant 15 minutes. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (D) Comptage des cellules après un traitement au ZOL avec ou sans C-US, réalisé 18 heures après le début des traitements. VI : valeur initiale, nombre de cellules initialement ensemencées. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM

Pour préserver le fonctionnement du transducteur, des puissances acoustiques supérieures n'ont pas été utilisées en raison d'un échauffement de la face arrière du transducteur proche de 60°C.

D. Pénétration du ZOL avec des US de faible intensité

Deux séries d'expériences sont présentées dans ce paragraphe et ont pour but d'évaluer si les séquences utilisées pour les C-US et les LIPUS favorisent la pénétration du ZOL au sein des cellules tumorales et si les effets induits par ces traitements peuvent durer dans le temps.

Les cellules MCF-7, traitées avec du PBS (témoin), des LIPUS, des C-US ou une hyperthermie seule (HT) ne présentent pas d'accumulation d'IPP ou d'ApppI. Comme attendu, des cellules MCF-7 traitées pendant 18 heures avec du ZOL présentent une accumulation intracellulaire d'IPP (730 ± 69 pmol/mg) et d'ApppI (911 ± 227 pmol/mg) due à la pénétration du BP par endocytose non spécifique (89).

Dans la première série d'expériences, les traitements (LIPUS, C-US ou HT) ont été appliqués durant 30 minutes sur les cellules MCF-7 en même temps que le ZOL (ZOL + US (OU HT)) (**Figure 24-A&B / histogrammes noirs**). Dans ces conditions, un traitement ZOL + HT augmente significativement l'accumulation intracellulaire d'IPP en comparaison avec du ZOL seul (1353 ± 535 pmol/mg vs 730 ± 69 pmol/mg ; $p < 0.05$). L'accumulation intracellulaire d'IPP est également significativement plus importante avec un traitement ZOL + LIPUS qu'avec uniquement du ZOL (1437 ± 244 pmol/mg vs 730 ± 69 pmol/mg ; $p < 0.01$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements ZOL + LIPUS et ZOL + HT. Un traitement ZOL + C-US induit la plus forte accumulation d'IPP (2111 ± 47 pmol/mg). Cette augmentation est significativement plus importante par rapport au ZOL seul ($p < 0.05$), ZOL + LIPUS ($p < 0.05$) et ZOL + HT ($p < 0.05$). L'accumulation d'ApppI mesurée est également plus importante dans le groupe ZOL + LIPUS (2728 ± 157 pmol/mg) par rapport au groupe ZOL (911 ± 227 pmol/mg ; $p < 0.05$). De la même façon que précédemment, les cellules traitées avec du ZOL et des C-US présentent la plus forte accumulation d'ApppI (3810 ± 351 pmol/mg). Cette valeur est significativement plus importante en comparaison avec le groupe ZOL ($p < 0.05$) (**Figure 24-A&B**).

Une seconde série d'expériences a été conduite pour évaluer si les différents traitements LIPUS, C-US ou HT pouvaient favoriser la pénétration du ZOL sur une durée plus longue que les 30 minutes pendant lesquelles ces traitements étaient appliqués. Ainsi, les LIPUS, C-US ou HT ont été appliqués durant 30 minutes sur les cellules MCF-7 puis le ZOL a été incubé à la fin de ces traitements pendant 18 heures (ZOL APRES US (OU HT)) (**Figure**

24-A&B / histogrammes blancs). Lorsque les cellules sont soumises à une HT puis incubées avec du ZOL (ZOL APRES HT), l'accumulation d'IPP et d'ApppI est respectivement de 1053 ± 49 pmol/mg et 2094 ± 256 pmol/mg. Ces résultats ne sont pas significativement différents de ceux obtenus lors de la première série d'expériences où les traitements hyperthermiques sont combinés à du ZOL ($p > 0.05$). Ils ne sont également pas significatifs par rapport au groupe ZOL seul ($p > 0.05$). Lorsque le ZOL est incubé après les C-US (ZOL APRES US), l'accumulation d'IPP (1498 ± 32 pmol/mg) et d'ApppI (2185 ± 38 pmol/mg) est significativement plus faible que lorsque les C-US sont appliqués en combinaison avec du ZOL ($p < 0.05$). Ce résultat demeure également significatif par rapport au ZOL seul ($p < 0.05$). Lorsque le ZOL est incubé après les LIPUS, les valeurs pour l'IPP et l'ApppI sont respectivement de 1332 ± 114 pmol/mg et 2113 ± 377 pmol/mg. Ces données ne sont pas statistiquement significatives par rapport au groupe ZOL ($p > 0.05$) (**Figure 24-A&B**).

Ainsi, si les C-US et les LIPUS favorisent la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales, seuls les effets des C-US permettent d'augmenter la pénétration du ZOL lorsque celui-ci est incubé à la fin des traitements ultrasonores. Le traitement des cellules avec une HT ne permet pas d'augmenter la pénétration de ZOL à des niveaux comparables à ceux obtenus avec les C-US. Ainsi, parmi les effets générés par les C-US, la stimulation mécanique qu'ils engendrent semble primordiale pour faciliter la pénétration de ZOL dans les cellules tumorales.

La viabilité cellulaire a été évaluée immédiatement après les traitements ultrasonores ou hyperthermiques et également 18 heures après (**Figure 24-C**). Dans les deux cas, le pourcentage d'intégration du 7-AAD dans les cellules tumorales est similaire pour tous les groupes traités (entre 5 et 10%) et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre tous les groupes. Enfin, la prolifération des cellules tumorales a été évaluée 18 heures après le début des traitements. Le comptage des cellules révèle que la prolifération cellulaire n'est pas affectée par les traitements, qu'ils soient ultrasonores ou hyperthermiques (**Figure 24-D**).

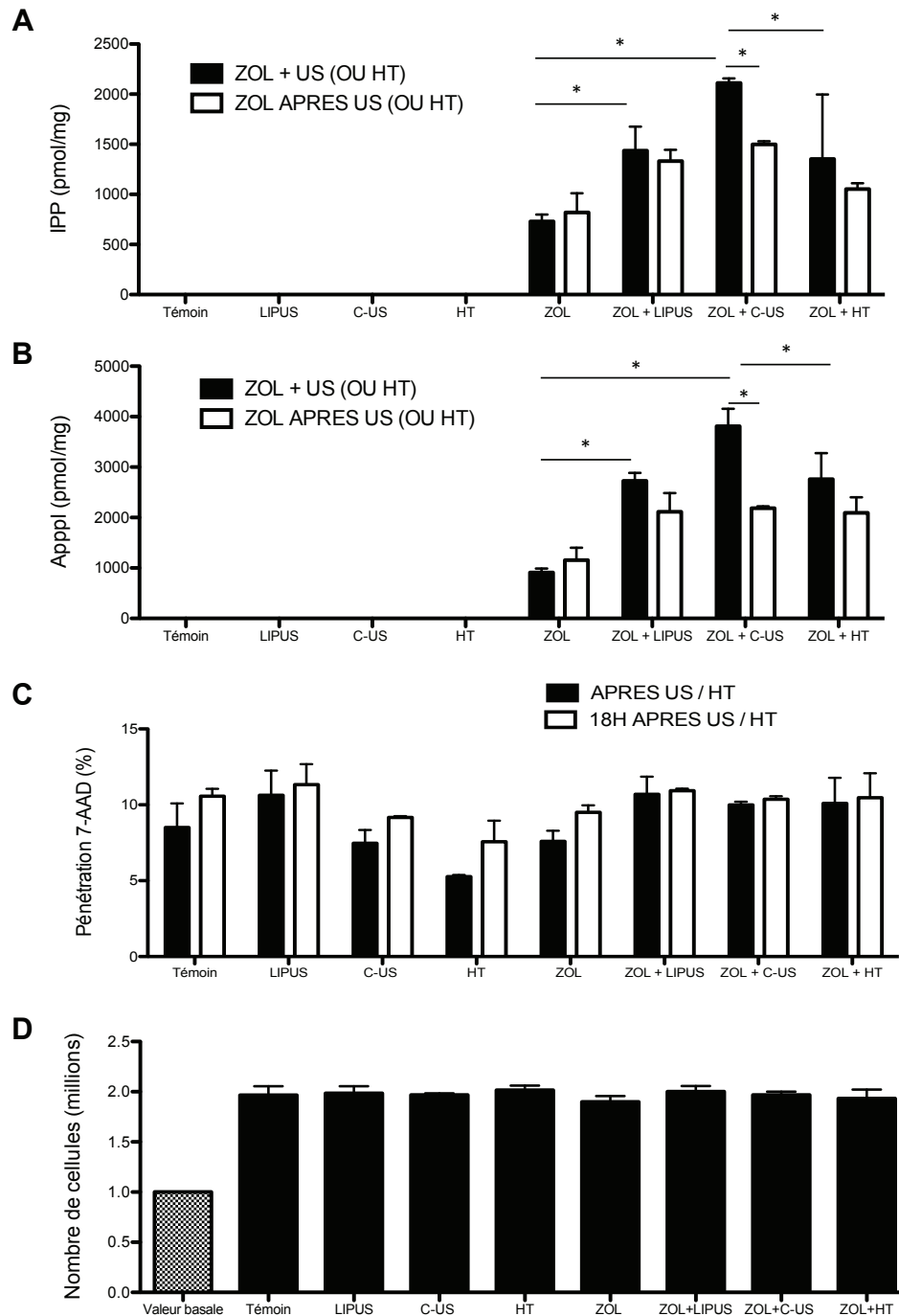


Figure 24 : Effets des US sur la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales

(A) Accumulation d'IPP dans les cellules MCF-7. Les traitements (C-US, LIPUS et HT) ont été appliqués simultanément avec le ZOL (barres noires) ou avant d'ajouter le ZOL (barres blanches). (B) Accumulation d'Apppl dans les cellules MCF-7. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio entre l'accumulation d'IPP ou d'Apppl (en pmol) et la quantité de protéines (en mg). La moyenne de ces résultats est présentée \pm SEM. * : $p < 0.05$ (C) Effets des C-US, LIPUS ou HT sur la viabilité cellulaire mesurée immédiatement après le traitement ultrasonore (*histogrammes noirs*) ou 18 heures après (*histogrammes blancs*). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (D) Comptage des cellules MCF-7 réalisé 18 heures après la fin des traitements ultrasonores. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM.

E. Pénétration du ZOL par endocytose induite par US

L'ultrastructure des cellules, visualisée par microscopie électronique à transmission a permis de compter les vésicules d'endocytose. Dans les cellules traitées avec du PBS (témoin), une moyenne de 5.1 ± 0.6 vésicules d'endocytose a été comptabilisée (**Figure 25**). Pour les cellules traitées au ZOL, une moyenne de 5.5 ± 1.1 vésicules d'endocytose a été recensée. Aucune différence statistique n'a été mise en évidence entre les cellules du groupe témoin et les cellules recevant le ZOL. Les cellules traitées par HT présentent un nombre de vésicules similaire (5.0 ± 1.7) en comparaison avec les groupes témoin et ZOL (**Figure 25-B**).

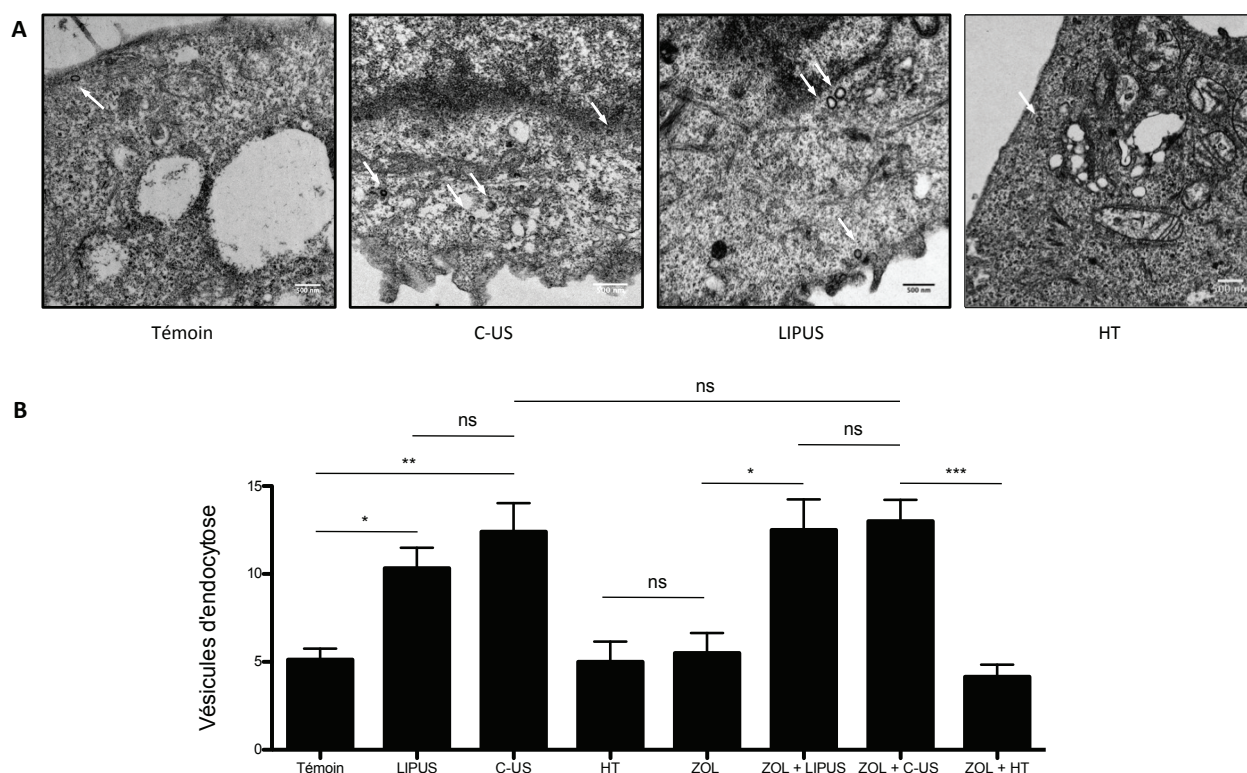


Figure 25 : Comptage des vésicules d'endocytose après un traitement C-US et LIPUS

Les cellules MCF-7 ont été traitées avec un contrôle (témoin, PBS) ou avec du ZOL en combinaison avec des LIPUS, des C-US ou une HT. (A) Images représentatives de l'ultrastructure des cellules MCF-7. Les flèches indiquent des vésicules d'endocytose. (B) Comptage des vésicules d'endocytose. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

Un traitement LIPUS en combinaison ($12,5 \pm 1,7$) ou non ($10,3 \pm 1,2$) avec du ZOL augmente de manière significative le nombre de vésicules d'endocytose en comparaison avec les groupes ZOL ($p < 0.05$) et témoin ($p < 0.05$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes LIPUS et ZOL + LIPUS. Un traitement ZOL + C-US ($12,4 \pm 1,6$) ou C-US ($12,5 \pm 1,7$) induit une augmentation significative du nombre de vésicules d'endocytose en comparaison avec les groupes ZOL ($p < 0.01$) et témoin ($p < 0.01$). De la

même façon que précédemment, aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes C-US et ZOL + C-US et entre les groupes HT et ZOL + HT.

Les clathrines et les cavéolines sont deux protéines impliquées dans les phénomènes d'endocytose (253). La présence de ces deux marqueurs a tout d'abord été évaluée à la fin des traitements ultrasonores. Un immunomarquage aux billes d'or a permis la localisation et le comptage de ces protéines au sein des cellules. Aucune différence n'a été mise en évidence pour l'accumulation de la cavéoline-2. Une augmentation significative du nombre de clathrines a été mise en évidence uniquement pour les groupes ultrasonores (**Figure 26-A&B&C**). Le nombre de billes d'or comptabilisé est ainsi environ 60% plus important dans les groupes C-US en comparaison avec les groupes témoin et ZOL ($p<0.001$). Le marquage des clathrines est 43% plus important dans les groupes LIPUS par comparaison avec les groupes témoin et ZOL ($p<0.001$). Le marquage des clathrines est 37% plus important dans les groupes C-US par rapport aux groupes LIPUS ($p<0.001$). De manière intéressante, l'accumulation de clathrines ne dépend pas de la présence du ZOL dans le milieu de culture puisqu'aucune différence significative n'est mise en évidence entre les groupes C-US et ZOL+C-US d'une part, et LIPUS et ZOL+LIPUS d'autre part. De plus, le nombre moyen de clathrines compté dans les échantillons ayant reçu une HT en combinaison avec ou sans ZOL est similaire à celui observé chez les échantillons témoin et ZOL. Ainsi, l'accumulation de clathrines dans les cellules est reliée à l'application des US (**Figure 26-C**).

La présence de clathrines dans le cytoplasme des cellules a été évaluée 10 minutes après la fin du traitement ultrasonore (**Figure 26-D**). Le nombre de billes d'or demeure deux fois plus important dans les échantillons ayant reçu des C-US en comparaison avec les groupes témoin et ZOL (**Figure 26-D**). De même, les cellules ayant reçu des LIPUS avec ou sans ZOL présentent une accumulation de clathrines similaire à celles traitées aux C-US. Il convient de noter que dans les deux cas, le nombre de billes d'or comptées 10 minutes après l'arrêt du traitement ultrasonore est inférieur à celui obtenu juste à la fin du traitement soulignant l'effet transitoire des US. Aucune différence n'est mise en exergue dans les groupes HT et ZOL + HT en comparaison avec les groupes témoin et ZOL (**Figure 26-D**). Enfin, ce comptage a été réalisé 18 heures après le début des expérimentations. Le nombre de billes d'or recensées pour les échantillons traités aux LIPUS est similaire à celui des groupes témoin et ZOL (**Figure 26-E**). Le nombre de clathrines chez les C-US, bien qu'inférieur à celui obtenu après le traitement ultrasonore ou 10 minutes, demeure encore statistiquement supérieur à celui des groupes témoin et ZOL ($p<0.001$) (**Figure 26-E**). De la même façon que précédemment, aucune différence n'a été notée concernant les groupes HT et ZOL + HT (**Figure 26-E**).

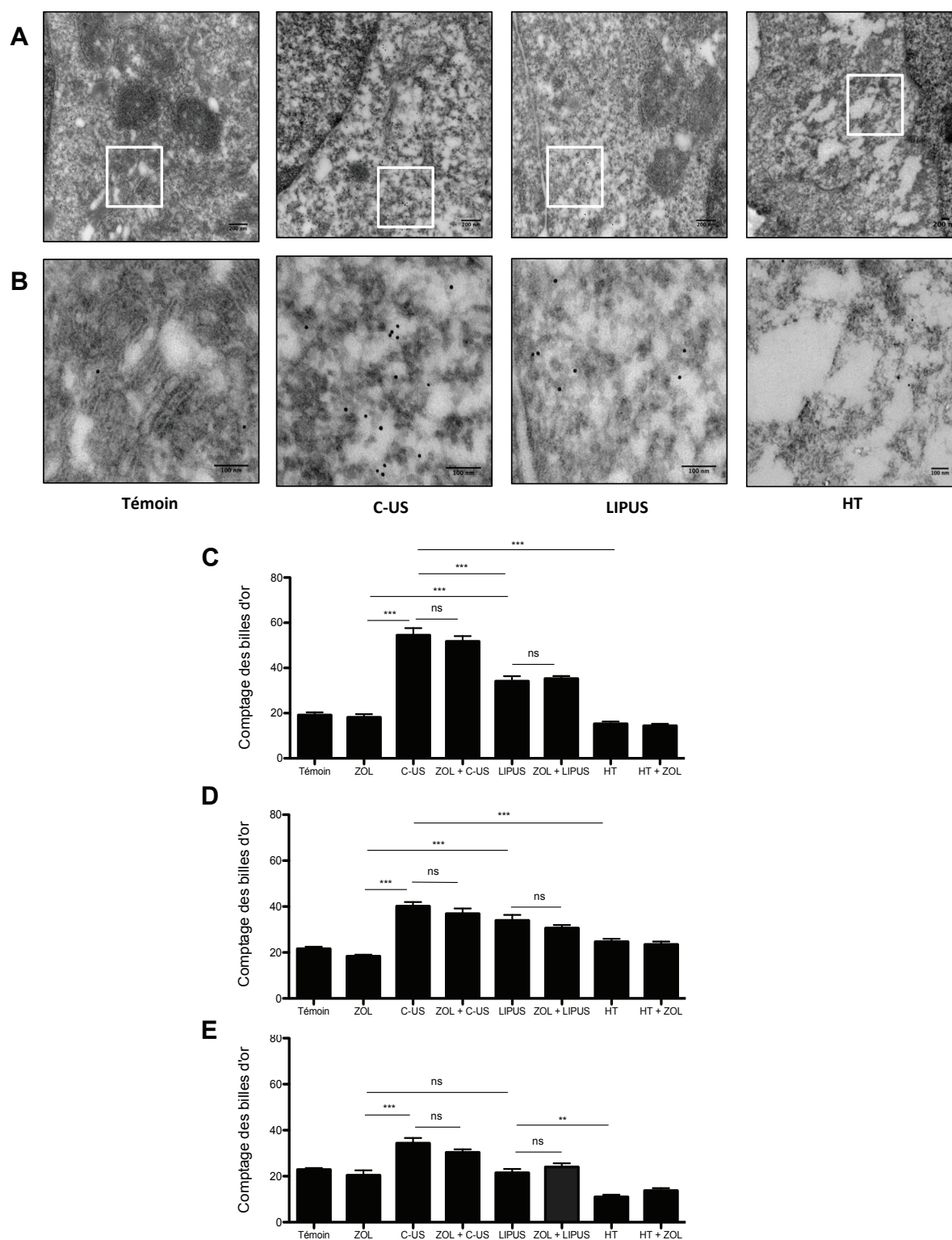


Figure 26 : Marquage des clathrines après un traitement C-US, LIPUS ou HT

(A) Les cellules ont été traitées avec des C-US, des LIPUS, une HT, avec ou sans ZOL. Elles ont été fixées immédiatement à la fin du traitement ultrasonore. (B) Observation des billes d'or dans le rectangle blanc indiqué en (A). Elles apparaissent sous la forme de petits points noirs réguliers et opaques. (C) Comptage des billes d'or marquant la clathrine immédiatement à la fin des LIPUS, C-US ou HT (D) Comptage des billes d'or marquant la clathrine 10 minutes après les traitements US ou HT. (E) Comptage des billes d'or marquant la clathrine 18 heures après les traitements US ou HT. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. **: $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$; ns : non significatif.

Ainsi, si le processus d'endocytose semble décroître avec le temps, les C-US permettent tout de même un processus d'endocytose plus long que les LIPUS.

F. Application au modèle tumoral MDA-MB-231/B02

Les premières étapes de ce travail ont été conduites sur des cellules MCF-7 qui présentaient l'intérêt d'exprimer les antigènes IPP et ApppI dosés ensuite par spectrométrie de masse. Ces expériences ont démontré le potentiel des US, notamment des C-US, pour favoriser la pénétration du ZOL dans des cellules tumorales. Les effets des C-US ont été évalués sur les cellules tumorales utilisées par la suite pour le modèle *in vivo* de métastases osseuses. Les cellules MDA-MB-231/B02 ont été traitées avec du ZOL pendant 1 heure ou 18 heures et ont reçu un traitement C-US pendant 30 minutes, immédiatement après l'ajout de ZOL dans le milieu.

Les cellules traitées avec du PBS (témoin) ou des C-US seuls n'accumulent pas d'IPP. Une heure de traitement au ZOL en combinaison avec des C-US augmente significativement l'accumulation intracellulaire d'IPP dans les cellules tumorales en comparaison avec le traitement au ZOL seul (respectivement 98 ± 19 pmol/mg et 220 ± 49 pmol/mg, $p < 0.05$). Un traitement au ZOL pendant 18 heures, en combinaison avec des C-US augmente l'accumulation intracellulaire d'IPP en comparaison avec le traitement au ZOL seul (430 ± 273 pmol/mg vs 939 ± 48 pmol/mg, $p < 0.05$) (**Figure 27-A**). Aucune accumulation d'ApppI n'a été notée, ceci étant dû à une spécificité des cellules MDA-MB-231/B02 qui ne génèrent pas d'ApppI (150). De plus, le comptage des cellules, réalisé 18 heures après le début de tout traitement, ne montre pas de différence entre tous les groupes. Ainsi, l'augmentation d'IPP résulte bien d'une augmentation de la pénétration du ZOL sous l'effet d'un traitement C-US et non d'un effet des C-US sur la prolifération des cellules (**Figure 27-B**). Une forte corrélation a également été établie entre l'accumulation d'IPP et la forme non prénylée de Rap1A dans les cellules B02 traitées avec du ZOL, seul ou en combinaison avec des C-US (**Figure 27-C**). La forme non prénylée de Rap1A est faiblement détectée pour les cellules traitées au ZOL pendant 1 heure. Elle est largement plus visible lorsque les cellules reçoivent un traitement C-US en combinaison avec du ZOL appliqué durant une heure. Un traitement au ZOL pendant 18 heures entraîne une accumulation plus marquée de la forme non prénylée de Rap1A. Aucune différence n'est cependant visible avec les cellules ayant reçu le ZOL durant 18 heures en combinaison avec un traitement C-US. L'accumulation de la forme totale de Rap1A n'est pas influencée par les différents traitements au ZOL seul ou en combinaison avec des C-US.

Les cellules B02 et MCF-7 ont été traitées avec un contrôle (- LOV, PBS) ou de la lovastatine (+ LOV), inhibiteur de la voie du mévalonate par action sur la FPP synthase (**Figure 27-C**). La LOV, en bloquant cette voie de signalisation, augmente l'accumulation de la forme non prénylée de Rap1A chez les MCF-7. Cette observation n'est pas réalisée pour les cellules B02. Cette différence peut être rapportée à la différence d'activité de la voie du mévalonate qui est plus faiblement exprimée dans les cellules B02 par rapport aux MCF-7. Cependant, nous avons montré qu'un traitement combiné ZOL + C-US induit l'accumulation intracellulaire de la forme non prénylée de Rap1A chez ces mêmes cellules tumorales. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle les C-US potentialiseraient l'effet anti-tumoral du ZOL *in vitro*.

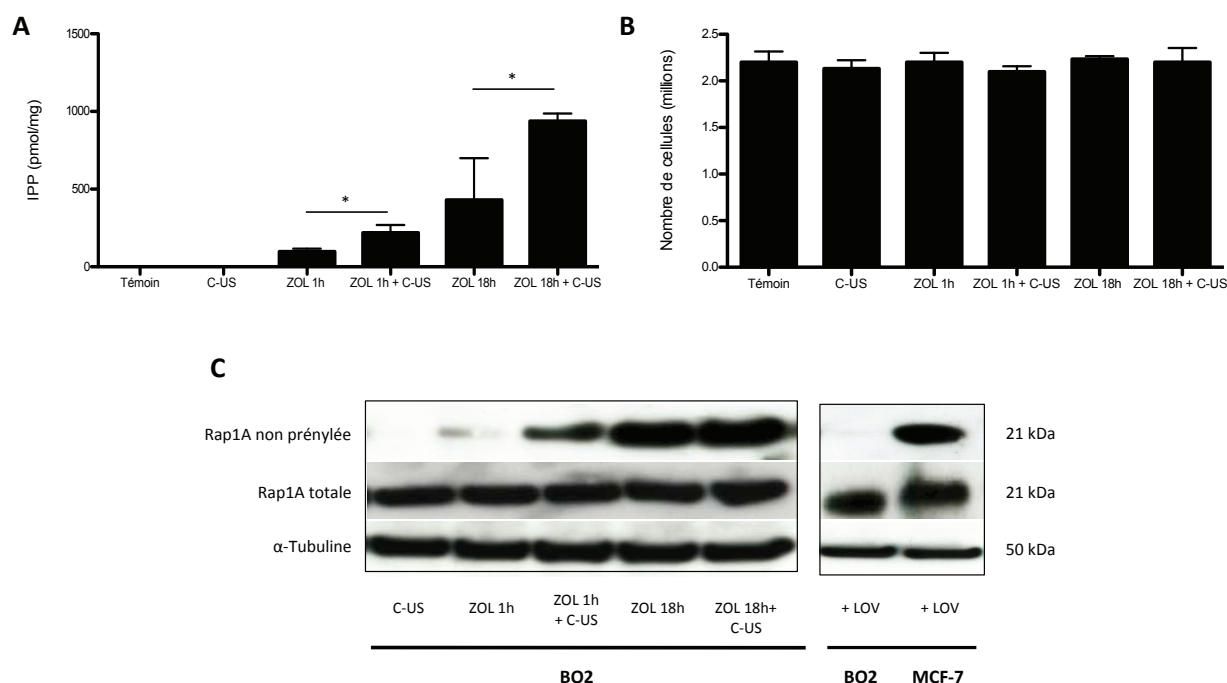


Figure 27 : Effets des C-US sur la pénétration du ZOL dans la lignée MDA-MB-231/B02

(A) Accumulation d'IPP mesurée par spectrométrie de masse dans les cellules MDA-MB-231/B02. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio entre l'accumulation d'IPP et la quantité de protéines (pmol/mg). (B) Comptage du nombre de cellules 18 heures après le début des traitements au ZOL. (C) Western Blot pour la forme totale et non prénylée de la protéine Rap1A. La tubuline est indiquée comme un contrôle de la quantité de protéines. *Panel gauche* : Cellules B02 traitées avec du ZOL pendant 1 heure ou 18 heures en combinaison avec des C-US. *Panel droit* : Rap1A sous sa forme prénylée et non prénylée dans des cellules B02 et MCF-7 traitées avec de la lovastatine (+ LOV) ou un contrôle (PBS, - LOV), inhibiteur de la voie du mévalonate. Les valeurs des poids moléculaires sont données.

V) CONCLUSION

Dans ce chapitre, l'appareillage ultrasonore et les sondes utilisées ont été décrits. Après une première étude consacrée à la calibration des sondes, nous avons défini des paramètres ultrasonores pour chacune des sondes de traitement. Les C-US induisent une hyperthermie

modérée (43°C) ainsi qu'un stress mécanique sur les cellules. Ce stress est lié à la production de pression de radiation et d'ondes de Lamb se propageant à la surface des boîtes de Pétri. Les US induisent également des micro-courants sous l'effet de ce stress mécanique susceptibles d'agir sur le passage du ZOL dans les cellules (254). Les LIPUS induisent seulement une stimulation mécanique des milieux insonifiés sans générer d'augmentation de la température *in vitro* ou *in vivo*. Dans les deux cas, les paramètres retenus n'induisent pas de cavitation car les niveaux de pression sont trop faibles aux fréquences utilisées. Les paramètres définis pour les C-US engendrent une augmentation de la température de 6°C chez les animaux, localisée au niveau de l'interface os-muscle. Aucune élévation de température n'a été constatée dans la cavité abdominale. Suite à cette augmentation de la température, aucune lésion tissulaire n'a été observée. Ce résultat est obtenu avec un transducteur plan dont le refroidissement permet de repousser la zone d'élévation de température à la bonne profondeur. En tenant compte des phénomènes d'absorption des tissus chez la souris, nous avons redéfini des paramètres *in vitro* de façon à induire une augmentation de la température jusqu'à 43°C. Comme attendu, aucune variation de température n'a été relevée *in vivo* et *in vitro* pour les LIPUS.

Le BP utilisé a été le ZOL. Dans ce premier chapitre, nous avons démontré que les US de faible intensité pouvaient potentialiser la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales. Dans un premier temps, la lignée tumorale MCF-7 a été choisie comme modèle cellulaire pour ces expérimentations. Les puissances acoustiques utilisées lors d'un traitement C-US ont été testées individuellement durant des temps d'exposition identiques afin d'évaluer leur effet sur la pénétration du ZOL. Une accumulation similaire d'IPP a été notée quelque soit la puissance acoustique constituant la séquence de traitement C-US. De manière intéressante, nous avons également noté qu'il n'était pas nécessaire d'augmenter la puissance acoustique afin de favoriser la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales. Ainsi, les paramètres choisis pour la séquence de traitement entraînent une accumulation d'IPP tout en augmentant la température de manière modérée. Nous avons ainsi conclu que ces paramètres constituaient le meilleur compromis pour une application *in vivo*.

Contrairement aux LIPUS, les C-US induisent une augmentation de température de 6°C mais également un stress mécanique sur les cellules en raison de la pression de radiation exercée ainsi qu'à la production de micro-courants et d'ondes de Lamb sur la surface des boîtes de Pétri. La pénétration du ZOL dans les cellules tumorales est significativement plus importante avec un traitement C-US par rapport à un traitement LIPUS. Ainsi, bien que le stress mécanique soit une composante essentielle pour potentialiser la pénétration du ZOL dans les cellules l'augmentation de température est également un facteur majeur. Des études

ont démontré qu'une hyperthermie de quelques degrés permettait d'augmenter la perméabilité des membranes cellulaires (255). Cependant, une HT seule n'affecte que légèrement la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales. Le stress mécanique induit par les US de faible intensité semble donc être un facteur clé pour augmenter la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales MCF-7. Son association avec une HT modérée conduit à une augmentation de la pénétration du ZOL.

Des travaux visant à identifier les phénomènes cellulaires impliqués dans l'augmentation de la pénétration du ZOL sous l'effet des LIPUS ou C-US ont montré le rôle majeur de l'endocytose induite par les clathrines. Les traitements C-US et LIPUS augmentent tous deux le nombre de vésicules d'endocytose de manière transitoire et ce, indépendamment de la présence du ZOL dans le milieu de culture. Ceci n'a pas été observé chez les cellules traitées avec une HT seule. Les traitements C-US et LIPUS induisent une augmentation de la quantité des clathrines au sein du cytoplasme des cellules tumorales. Des expériences supplémentaires sont cependant nécessaires afin de mieux comprendre l'impact des US sur l'endocytose. Une première étape pourrait consister à bloquer spécifiquement l'endocytose médiée par les clathrines et les cavéolines (256) et d'observer dans ces conditions l'effet des US. De plus, l'accumulation davantage prononcée d'IPP et d'ApppI suite à un traitement C-US en comparaison avec un traitement LIPUS suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans la pénétration du ZOL. Ces mécanismes restent à investiguer.

Ces premiers essais ont été conduits sur une lignée cellulaire exprimant les deux métabolites IPP et ApppI avant d'être réitérés dans le modèle cellulaire MDA-MB-231/B02 dont la voie du mévalonate est plus faiblement exprimée. Ce modèle a par la suite été utilisé pour les essais *in vivo* comme modèle de métastases osseuses. Ces expérimentations ont permis de conclure que les C-US permettent également une forte augmentation de la pénétration du ZOL dans ces cellules tumorales et un blocage de la prénylation de la protéine Rap1A. Ainsi le traitement C-US a un fort effet sur la voie du mévalonate sur cette lignée cellulaire. Ces résultats obtenus sur des culture cellulaires ont permis ainsi le passage au modèle de métastase osseuse *in vivo*.

CHAPITRE 3

Potentialisation *in vivo* de l'effet anti-tumoral d'un bisphosphonate par ultrasons de faible intensité

I) CONTEXTE CLINIQUE ET HYPOTHESE

Les BP permettent de stopper la progression des lyses osseuses (249) mais n'ont pas d'effet antitumoral direct à la posologie prescrite aux patientes. Des effets anti-tumoraux ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* (148) mais à des doses élevées, incompatibles avec un usage clinique. D'autres études ont montré que des doses métronomiques pouvaient avoir un effet antitumoral (257). La disponibilité des BPs est donc un point important afin qu'ils aient un effet antitumoral. La forte affinité du BP pour le minéral osseux limite sa biodisponibilité pour les cellules tumorales (87) et limite donc l'effet antitumoral. Sur la base de ces données et des travaux précédemment décrits, les hypothèses explorées dans ce chapitre consistent à évaluer si les C-US induisent la pénétration d'un BP délivré à une dose cliniquement acceptable dans les cellules tumorales. Les essais ont été menés *in vivo* sur un modèle de métastases osseuses puis dans un modèle de tumeur mammaire sous-cutanée. Afin d'approfondir l'étude des mécanismes impliqués, un BP fluorescent a permis de suivre sa répartition dans l'os au cours du temps sous l'effet des traitements ultrasonores.

II) MATERIEL ET METHODES

A. Modèle de xénogreffe MDA-MB-231/B02

Des souris Balb/c nude (Janvier, St Berthevin, France) de 4 semaines ont été utilisées. Il s'agit d'un modèle immunodéficient, déplété en lymphocytes T. Les animaux ont été injectés avec des cellules MDA-MB-231/B02 (5×10^5). Ces cellules ont la propriété de métastaser uniquement à l'os lorsqu'elles sont injectées dans l'artère caudale des animaux (249). Les

métastases se forment au niveau des pattes postérieures (tibias, fémurs) et plus rarement au niveau des crêtes iliaques. Les premières lyses osseuses peuvent être observées environ 18 jours après injection des cellules tumorales. Elles progressent assez rapidement en 2 semaines jusqu'au 32^{ème} jour, date à laquelle le protocole est stoppé étant donné l'étendue des lyses osseuses.

Le modèle animal Balb/c nude a également été utilisé dans le cadre d'un protocole de tumorigenèse. Les cellules MDA-MB-231/B02 (1 million) ont été injectées par voie sous-cutanée sur le dos des animaux en contention. Dans ce modèle de xénogreffe, une tumeur apparaît généralement 30 jours après injection. Le volume tumoral a été mesuré selon la formule : $(\text{largeur}^2 \times \text{longueur})/2$ (151). Lorsque les tumeurs ont atteint un volume de 30 mm³, les souris sont réparties dans les différents groupes de traitement.

B. Protocole animal en situation de métastase osseuse

1. Synopsis

Les cellules tumorales MDA-MB-231/B02 ont été injectées aux souris au premier jour du protocole (J0) par voie intra-artérielle. Les premières lyses osseuses ont été visibles environ 18 jours après l'injection, date à laquelle les souris sont radiographiées. Cette étape a permis de répartir les souris dans les groupes de traitement de façon homogène. A J18, les souris ont reçu une dose unique de ZOL par injection sous-cutanée à la posologie de 100 µg/kg. Cette dose a été calculée équivalente à celle utilisée en clinique (4 mg pour une patiente d'environ 60 kg). Cette injection a été immédiatement suivie d'un traitement ultrasonore C-US. Ces traitements ont été appliqués une seule fois ou répétés quotidiennement jusqu'à J32. Deux autres étapes de radiographies ont été effectuées à J25 et J32 afin d'évaluer la progression des lyses osseuses pendant et à la fin du traitement. Les souris ont été mises à mort à J32. Le sang ainsi que les pattes postérieures ont été prélevés afin de réaliser respectivement des dosages sériques de marqueurs osseux (TRAcP 5b), une analyse histologique et une analyse des moelles osseuses des souris traitées (**Figure 28**). Ce protocole a été préalablement validé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon I (n°BH2010-45).

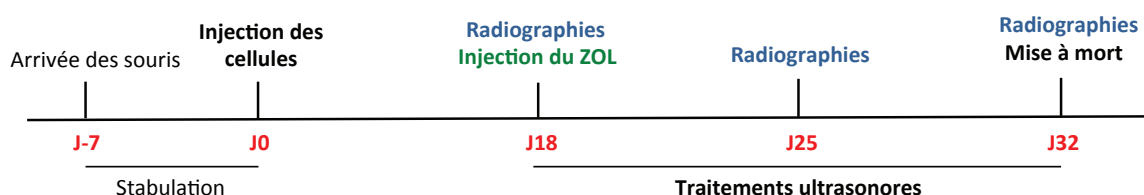


Figure 28 : Synopsis du protocole animal mimant une situation de métastases osseuse

Les souris ont été réceptionnées 1 semaine avant toute manipulation. A J0, elles ont reçu une injection intra-artérielle de cellules tumorales MDA-MB-231/B02. Les métastases osseuses apparaissent environ 18 jours après l'injection. A J18, les souris ont été radiographiées et réparties dans les groupes de traitement. Elles ont reçu une injection unique de ZOL suivie par des traitements ultrasonores C-US, appliqués une seule fois ou répétés quotidiennement jusqu'à J32. Les souris sont radiographiées à J25 et J32 et mises à mort à J32.

Les souris ont été pesées le premier jour du protocole puis tous les deux jours à partir du 18^{ème} jour et ce, jusqu'au 32^{ème} jour afin d'évaluer la tolérance du traitement. Différents groupes ont été formés afin d'évaluer l'effet des US sur la progression des lyses osseuses et des masses tumorales dans la cavité osseuse (**Tableau 3**). Un premier groupe témoin a été formé afin d'évaluer la prise tumorale et la progression des lyses osseuses chez des souris non traitées. Un deuxième groupe de souris a été constitué recevant uniquement l'injection de ZOL à J18 pour évaluer l'efficacité du BP seul. Un troisième groupe de souris a été traité une seule fois par C-US juste après l'injection de ZOL à J18. Ce groupe a été constitué afin d'évaluer si un traitement C-US permet la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales lorsque le ZOL circule dans le sang avant qu'il ne soit minéralisé dans l'os. Pour un quatrième groupe de souris, le traitement par C-US a été répété quotidiennement entre J18 et J32 sans injection de ZOL. Enfin le dernier groupe associe une injection de ZOL à J18 et des traitements quotidiens aux C-US entre J18 et J32. Ce groupe a été constitué afin d'évaluer si un traitement C-US permet la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales après qu'il soit minéralisé dans l'os.

Groupe	Dénomination	Effet évalué
Témoin	Témoin	Prise tumorale, progression des lyses osseuses
Ultrasons continus	C-US	Effets des C-US seuls
Zolédronate	ZOL	Effet du traitement de référence
Zolédronate + Ultrasons continus, une fois	ZOL + C-US Uni	Effet des C-US quand le ZOL circule dans le sang
Zolédronate+ Ultrasons continus quotidiens	ZOL + C-US Quo	Effet des C-US quand le ZOL est lié à l'os

Tableau 3 : Groupes de traitements et effets évalués.

Ce tableau présente les groupes formés lors du protocole de métastases osseuses. Un groupe témoin a été formé dans le but d'attester de la bonne progression des lyses osseuses chez des souris ne recevant aucun traitement. L'effet d'ultrasons continus seuls (C-US) a été également évalué. Enfin l'effet du zolédronate seul (ZOL) ou en association avec des ultrasons continus, appliqués une fois (ZOL + C-US Uni) ou pendant deux semaines (ZOL + C-US Quo) a été testé.

Après une anesthésie gazeuse (isoflurane) dans une chambre d'induction, les souris ont été placées soit sur un support plastifié (groupes témoin et ZOL), soit sur du gel échographique recouvrant les absorbants dans le but de recevoir le traitement ultrasonore. Le traitement quotidien ultrasonore a nécessité une adaptation des doses d'anesthésie gazeuse. Ainsi, les taux d'isoflurane administrés ont été réduits au maximum de façon à ne pas engendrer d'hypothermie. De la même façon, le gel échographique a été préalablement réchauffé par une couverture chauffante afin d'éviter une baisse de la température corporelle des animaux pendant les traitements. Les souris ont été positionnées sur le dos avec le museau placé dans le masque d'anesthésie. Du gel échographique a été disposé pour recouvrir la partie basse de la souris ainsi que son abdomen, afin d'assurer le couplage acoustique. La sonde ultrasonore a été enveloppée dans un ballonnet stérile (Civflex, EDM) et rempli de liquide de couplage (Ablasonic, EDAP-TMS). L'ensemble a été placé au-dessus de la souris, au niveau des pattes postérieures et au contact du gel échographique (**Figure 29**).

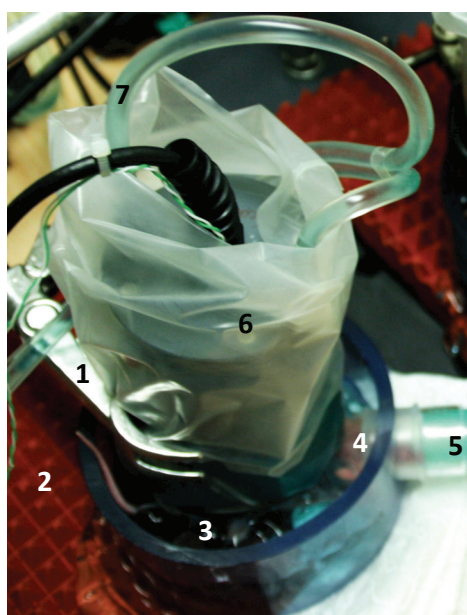


Figure 29 : Traitement ultrasonore *in vivo*

Photographie d'un traitement ultrasonore en cours. La photographie a été prise au-dessus de la zone de traitement. 1 : Pince tenant la sonde ultrasonore ; 2 : absorbant ; 3 : gel échographique ; 4 : souris anesthésiée ; 5 : masque relié au système d'anesthésie ; 6 : sonde ultrasonore enveloppée dans un ballonnet stérile ; 7 : système de refroidissement relié à la sonde ultrasonore.

La veille de la mise à mort, les souris ont été mises à jeun en vue des prélèvements sériques. Le jour de la mise à mort, les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (130 mg/kg) et de xylazine (8,8 mg/kg). Une ponction intracardiaque a été réalisée afin de réaliser des dosages sériques. Le sang a ensuite été centrifugé à une vitesse de 2500 rpm durant 20 minutes à 4°C. Le sérum a été récupéré puis

placé à -80°C jusqu'à son utilisation. Les souris ont été mises à mort par dislocation cervicale. Dans une première série d'expériences, les pattes postérieures ont été prélevées et placées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 4 jours sous agitation. Le PFA a ensuite été éliminé et remplacé par une solution d'Osteosoft® (Merck Millipore) afin de décalcifier l'os. Les os ont ensuite été déshydratés puis inclus dans des cassettes de paraffine (VWR) pour une analyse histologique. Lors de la deuxième série d'expériences, la moelle osseuse a été extraite des os des pattes postérieures en faisant passer une seringue remplie de PBS dans la cavité osseuse. Les moelles ont ensuite été centrifugées à une vitesse de 1000 rpm durant 5 min à 23°C. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans du tampon de lyse RIPA (Sigma-Aldrich) supplémenté en inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich), puis conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

2. Histologie

Les tibias des pattes postérieures ont été coupés à l'aide d'un microtome (Microm, France). La taille des coupes a été fixée à 5 µm. Après fixation des coupes par une solution d'eau et de gélatine, les lames ont été mises à l'incubateur à 37°C durant une nuit.

Les coupes ont ensuite été colorées au trichrome de Goldner afin d'identifier la masse tumorale présente au sein de la cavité osseuse et les structures osseuses. Cette coloration permet de mettre en évidence l'os minéralisé en vert, les cellules de la moelle osseuse et tumorales en marron et le muscle en rouge. Une analyse histomorphométrique a été réalisée par la suite. Elle a permis de mesurer le volume osseux (BV/TV : bone volume/total volume) et également la masse tumorale rapportée au volume de tissu mou au sein de la cavité osseuse (TB/STV : tumor burden/soft tissue volume). L'analyse histomorphométrique a été réalisée sur le logiciel Bone (Visiolab 2000).

L'activité des ostéoclastes a été évaluée *in situ* par un marquage dit TRAP (tartrate-resistant alkaline phosphatase) Staining (Sigma-Aldrich). Ce marquage, réalisé sur des coupes de tibias, met en évidence une enzyme, la phosphatase acide résistante au tartrate. Les ostéoclastes actifs apparaissent en violet foncé. La surface des ostéoclastes présentant une activité forte enzymatique a été mesurée et rapportée à la surface de l'os en contact avec la masse tumorale. L'analyse a été réalisée sur le logiciel Bone (Visiolab 2000). L'activité des ostéoclastes a également été évaluée par un dosage ELISA (Immunodiagnosics Systems, Paris, France). Le TRAcP 5b est dosé à partir du sérum, comme un marqueur indirect de l'activité des ostéoclastes.

Deux analyses d'immunohistochimie ont été réalisées sur les sections métaphysaires des pattes postérieures. Les marquages ont été réalisés sur un automate d'immunomarquage (Ventana Discovery XT, Roche, Meylan, France). Les coupes ont été incubées avec un anticorps monoclonal de souris anti-Ki-67 humain (MIB-1, Dako, Trappes) pour reconnaître spécifiquement les cellules en état de prolifération ou avec un anticorps polyclonal de lapin anti-CD31 (AnaSpec, Fremont) afin de mettre en évidence les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins. Les coupes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à la HRP (SantaCruz Biotechnology). Le nombre de vaisseaux sanguins, attesté par le marquage des cellules épithéliales a été quantifié et rapporté à la surface tumorale. Le nombre de noyaux positifs au Ki-67 a également été comptabilisé de manière automatique (Histolab®, Microvision Instruments, France) et utilisé pour définir l'index mitotique comme le pourcentage des noyaux positifs au Ki-67 sur le nombre total de noyaux comptabilisés.

3. Western Blot

Les extraits de moelle osseuse ont été centrifugés à la vitesse de 2000 rpm durant 20 min à la température de 4°C. L'accumulation intracellulaire de Rap1A, sous sa forme totale et sous sa forme non prénylée, a été évaluée par Western Blot selon la même démarche que celle décrite dans le chapitre 2 (page 68).

4. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées avec les logiciels R® (The R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche) et GraphPad Prism (La Jolla, USA). Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé en formulation bilatérale. La puissance du test a été fixée à 95% avec un niveau de significativité $\alpha=0.05$.

C. Utilisation d'un bisphosphonate fluorescent

1. Synopsis

Cette étude a été menée pour visualiser la répartition d'un BP au sein du milieu osseux sous l'effet des US. Le BP fluorescent a été fourni par le Dr Hal Ebetino. Un BP fluorescent (risédronate couplé à une molécule de fluorescéine, FAM-RIS) a été injecté par voie intra-artérielle à des souris Balb c nude anesthésiées. Le FAM-RIS, re-suspendu dans du PBS, a été injecté à la posologie de 0,35 mg/kg (258) au premier jour du protocole (J0). Les

traitements ultrasonores C-US ont débuté après l'injection et ont été réalisés avec les mêmes paramètres que décrits précédemment. Ils ont ensuite été appliqués tous les jours de J0 à J13 (**Figure 30**). Trois groupes de traitement ont été constitués : un groupe témoin afin d'évaluer l'autofluorescence des pattes ; un groupe ne recevant que le FAM-RIS et enfin, un groupe associant le FAM-RIS et des C-US afin d'évaluer la quantité de BP présente dans les os des pattes à l'issue de plusieurs jours de traitements ultrasonores. Après anesthésie, les animaux ont été mis à mort à J13 par dislocation cervicale. Ce protocole a été validé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (n° DR2014-12).



Figure 30 : Synopsis du protocole avec le BP fluorescent

Les souris ont été placées en stabulation durant 7 jours avant toute manipulation. A J0, elles ont reçu sous anesthésie gazeuse, une injection intra-artérielle de BP fluorescent (FAM-RIS) à la posologie de 0,35 mg/kg ou du PBS pour les souris du groupe témoin. Le traitement ultrasonore C-US a débuté juste après l'injection du FAM-RIS et a duré 30 minutes. Le traitement ultrasonore a été répété quotidiennement durant 13 jours. Les pattes postérieures ont été prélevées pour une analyse de la fluorescence après traitement.

2. Prélèvements et histologie

Après avoir récupéré les pattes postérieures des animaux, les os ont été placés dans de l'éthanol 70% (VWR) pendant une semaine pour assurer la fixation des structures histologiques. Les échantillons ont ensuite été déshydratés puis plongés dans du méthylcyclohexane (VWR) pendant 2 jours. Puis, les pattes ont été placées dans du méthylcyclohexane contenant des concentrations croissantes en peroxyde de benzoyle (Merck). Enfin, elles ont été placées à l'étuve (37°C) pendant 1 semaine. Une fois le processus d'inclusion achevé, des sections d'os de 8 µm ont été réalisées au microtome (LeicaSM 2500, Germany). Les coupes ont ensuite été déshydratées, trempées dans du méthylcyclohexane (VWR) et finalement fixées avec du Neo-entellan (VWR).

3. Analyse des résultats

Les lames ont été observées au microscope à épi-fluorescence (Zeiss Axio Imager et Filter Set 09, excitation BP 450-490, beamsplitter FT 510, emission LP 515, Iena, Germany). Chaque image a été évaluée, en aveugle (par deux interprètes), au moyen du logiciel ImageJ. Deux paramètres ont été mesurés : d'une part, la mesure des surfaces où le FAM-RIS a

adhéré ; d'autre part l'intensité de fluorescence associée. Ces deux paramètres ont été rapportés à la mesure des volumes osseux qui a été effectuée en aveugle sur les mêmes coupes par le logiciel ImageJ. Ces mesures ont été préalablement calibrées et réalisées de manière automatique. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio entre le volume osseux où le bisphosphonate a adhéré (BPf.V, en mm) et le volume osseux total (BV, en mm²) et l'intensité de fluorescence (IDV) rapportée au volume osseux total (BV, en mm²).

4. Test statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA). Le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé en formulation bilatérale. La valeur d'alpha a été fixée à 5% et la puissance de ce test a été fixée à 80%. Un calcul préalable a permis de déterminer que 8 animaux par groupe de traitement étaient nécessaires à la réalisation de cette analyse statistique. Dans un souci de réduction des effectifs et en accord avec le comité d'éthique de l'Université de Lyon 1, seuls les groupes BP seul et BP + US ont été formés.

D. Protocole de tumorigenèse

1. Synopsis

Les cellules MDA-MB-231/B02 ont été injectées par voie sous-cutanée à des souris Balb c nude. L'apparition de tumeurs a été évaluée régulièrement. Les souris ont été incluses dans les protocoles de traitement lorsque le volume tumoral a été de 30 mm³. Les animaux ont reçu une dose de ZOL, par voie sous-cutanée, à la posologie de 100 µg/kg. Les traitements C-US ont été appliqués quotidiennement pendant 7 jours ou 15 jours après l'injection du BP. Le protocole a été ainsi arrêté à ces deux moments différents. Les tumeurs sous-cutanées ont été prélevées après la mise à mort des animaux.

Les groupes de traitement de ce protocole ont été similaires à ceux présentés précédemment. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux impliqué dans cette étude et suite aux résultats obtenus en situation de métastases osseuses, le groupe pour lequel le traitement C-US était appliqué une seule fois (ZOL + C-US Uni) après injection du BP n'a pas été constitué.

2. Prélèvements et immunohistochimie

La tumeur sous-cutanée a été prélevée et pesée au moyen d'une balance de précision (Dutscher, Brumath, France). La tumeur a ensuite été coupée en deux : une partie a été congelée dans de l'azote liquide pour mener une analyse de la forme non-prénylée de Rap1A

par Western Blot, l'autre partie a été plongée dans du formol avant son inclusion en paraffine. Des analyses immuno-histochimiques (Ki-67, CD31) ont été réalisées afin d'évaluer l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales selon la même démarche que celle décrite pour le protocole de métastases osseuses.

3. Test statistique

L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA). Le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé en formulation bilatérale. La valeur d'alpha a été fixée à 5% et la puissance de ce test a été fixée à 80%. Un calcul préalable a permis de déterminer que 8 animaux par groupe de traitement étaient nécessaires à la réalisation de cette analyse statistique. Dans un souci de réduction des effectifs, le groupe ZOL + US Uni n'a pas été formé, suite aux résultats obtenus en situation de métastases osseuse.

III) RESULTATS

A. Tolérance des traitements

Les souris présentent toutes une prise de poids régulière. Les valeurs observées à J0, bien qu'un peu faibles, correspondent aux valeurs relatives à des souris âgées de 4 semaines. La prise de poids augmente jusqu'à atteindre environ 20 grammes à l'âge de 8 semaines. Aucune différence significative n'a été mise en évidence lors des 5 pesées entre les groupes ZOL et ZOL + C-US Quo suggérant une bonne tolérance du traitement ultrasonore pendant 2 semaines (**Figure 31**).

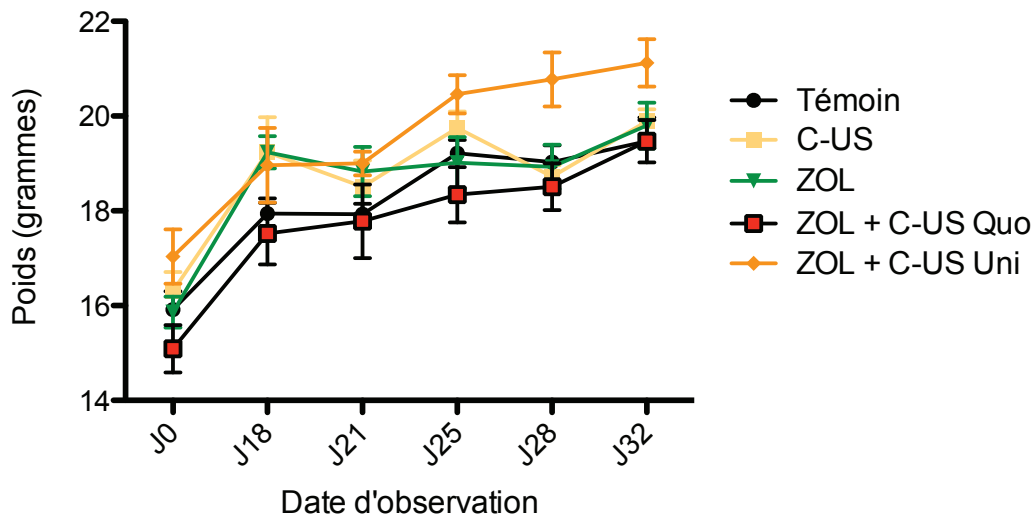


Figure 31 : Evolution du poids des animaux au cours du protocole de métastases osseuses

Les animaux ont été pesés le jour de l'injection des cellules tumorales, à J0. La pesée a ensuite été effectuée à J18, premier jour du traitement. Les souris ont reçu alors une dose de zolédronate (ZOL) avec ou sans traitement C-US. Le poids des animaux a ensuite été évalué à J21, J25, J28 et J32. Témoin : injection de PBS à J18, C-US : traitement C-US appliqué quotidiennement entre J18 et J32, ZOL : injection de ZOL à J18, ZOL + C-US Uni : injection de ZOL puis un seul traitement C-US, ZOL + C-US Quo : injection de ZOL puis traitement C-US appliqué quotidiennement entre J18 et J32. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM.

Plusieurs complications ont été observées au cours du protocole. Parmi elles, nous avons noté trois cas de paralysie des membres inférieurs dont deux dans le groupe C-US et un dans le groupe ZOL. L'autopsie réalisée sur ces trois animaux n'a pas permis d'identifier la cause précise de cette paralysie. Parmi les 33 souris traitées par C-US dans le protocole de métastases osseuses, 5 cas de brûlures cutanées superficielles ont été mis en évidence lors de l'utilisation du dispositif. Ces brûlures ont été localisées sur le côté dorsal de l'animal suggérant une possible réflexion ultrasonore par manque de couplage avec l'absorbant. Elles ont causé une perte de poids faible dans un premier temps mais n'ont pas justifié l'arrêt du traitement. Aucune complication n'a suivi l'apparition de ces brûlures. Celles-ci ne sont plus apparues dès lors qu'un soin minutieux a été apporté à la mise en place du gel échographique autour de la souris et sur l'absorbant. Comme l'attestent les courbes de poids et l'observation d'effets secondaires mineurs, les traitements ultrasonores ont donc été bien tolérés par les animaux.

B. Evaluation des lyses osseuses

Comme attendu, les premières lyses osseuses ont été visibles environ 18 jours après l'injection des cellules tumorales dans l'artère caudale (249). Une première évaluation de l'étendue des lyses osseuses a été effectuée par radiographie à J18. Les animaux ont également été radiographiés à J25 et J32 afin d'évaluer l'efficacité du traitement. A J18, la surface ostéolytique moyenne était de 0,54 mm² (**Figure 32-B**). Aucune différence

significative n'a été observée entre les différents groupes ce qui démontre l'homogénéité des groupes constitués. La même analyse, réalisée à J25, montre une augmentation similaire des lésions ostéolytiques dans tous les groupes, traités ou non, sans différence statistiquement significative entre les groupes (**Figure 32-B**). L'analyse réalisée 32 jours après l'injection des cellules tumorales a montré qu'il n'y avait aucune différence significative sur la taille des lésions ostéolytiques entre les groupes témoin et C-US (respectivement $6,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ et $7,4 \pm 1,3 \text{ mm}^2$, $p=0.60$), soulignant que les US seuls n'ont aucun effet sur la progression des lyses osseuses (**Figure 32-B&C**). Comme attendu, une injection de ZOL permet de diminuer significativement les lésions ostéolytiques par rapport au groupe témoin ($6,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ vs $3,0 \pm 0,4 \text{ mm}^2$; $p<0.001$) (**Figure 32-B&C**). L'injection de ZOL suivie d'un traitement C-US appliqué une seule fois (ZOL + C-US Uni) ne permet pas de diminuer les lésions ostéolytiques par rapport au groupe ZOL (respectivement $6,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ et $3,9 \pm 0,9 \text{ mm}^2$; $p=0.30$) signifiant qu'un seul traitement C-US n'apporte pas de bénéfice par rapport à la seule injection de ZOL (**Figure 32-B&C**). Enfin, des C-US répétés quotidiennement et associés à une seule injection de ZOL entraîne une diminution significative des lésions ostéolytiques par rapport au groupe ZOL ($6,5 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ vs $1,3 \pm 0,2 \text{ mm}^2$; $p<0.001$). Les lésions sont 57% moins étendues par rapport au groupe ZOL et 80% par rapport au groupe témoin (**Figure 32-A&B&C**).

Ainsi, les C-US seuls appliqués quotidiennement n'ont pas d'effet sur la progression des lyses osseuses. Une dose de ZOL permet de diminuer les lésions ostéolytiques par rapport au groupe témoin. Un traitement C-US appliqué une seule fois lorsque le ZOL est encore circulant dans le sang ne permet pas d'obtenir un effet supplémentaire comparé à l'injection seule de ZOL. Des traitements C-US réalisés juste après l'injection de ZOL puis répétés quotidiennement pendant 14 jours permettent de diminuer les lésions ostéolytiques de manière significative par rapport au groupe ZOL.

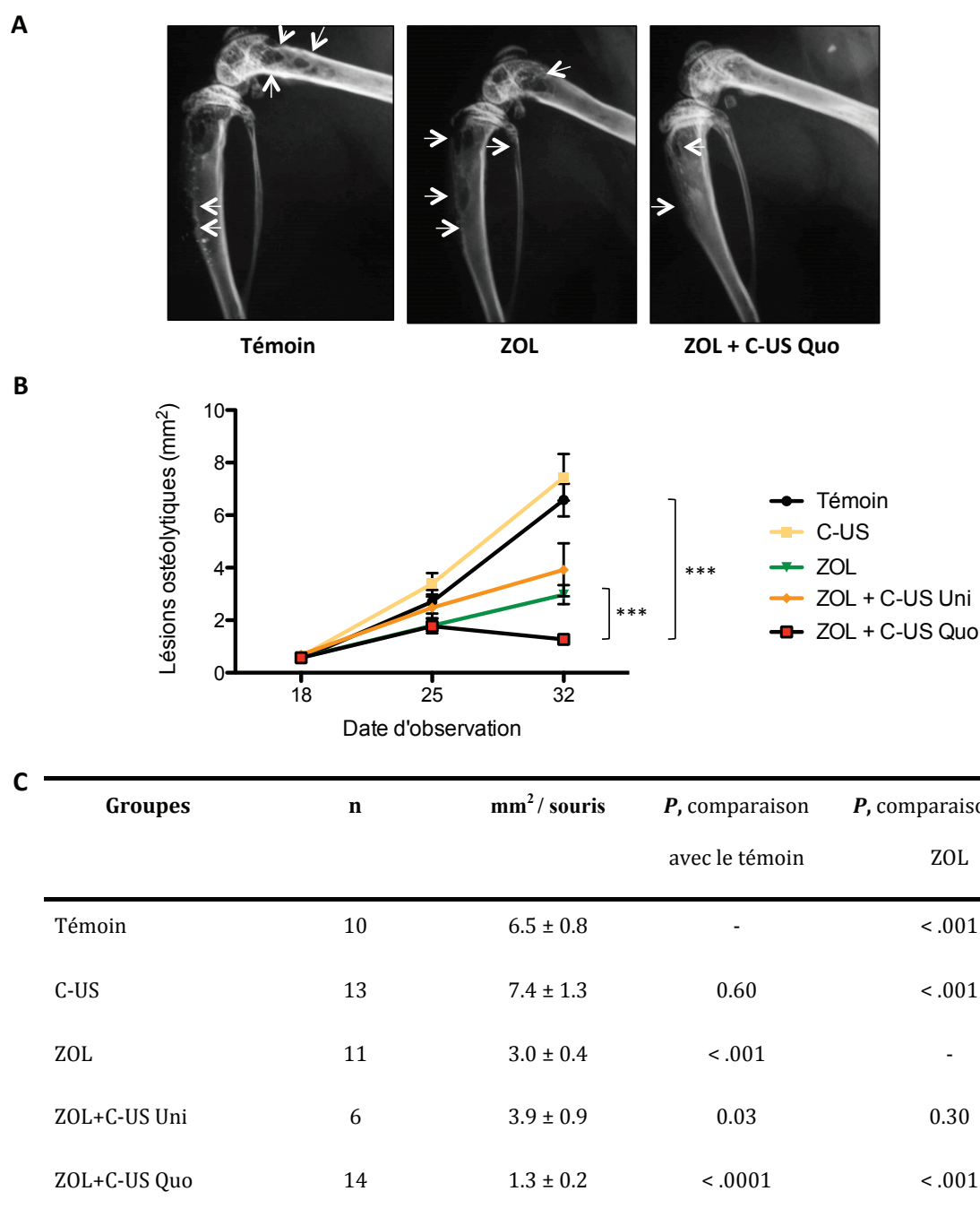


Figure 32 : Evolution des lyses osseuses par radiographie sous l'effet de C-US et de ZOL

(A) Radiographies des fémurs et tibias prises à J32. De gauche à droite : témoin, ZOL (zolédronate seul) et ZOL + C-US Quo (ZOL + C-US quotidiens). Les lésions ostéolytiques sont indiquées par les flèches. (B) Evolution des lyses osseuses entre les 18^{ème} et 32^{ème} jours du protocole. Les lésions ostéolytiques ont été mesurées sur chaque patte, au niveau du tibia, du fémur et des crêtes iliaques. Une somme a été effectuée entre les deux pattes postérieures de la souris. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± SEM. C-US : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement, ZOL : zolédronate, C-US : Traitement ultrasonore quotidien, ZOL + C-US Uni : Traitement ultrasonore appliqué une seule fois après l'injection de ZOL. *** : $p < 0.001$. (C) Mesures des lésions ostéolytiques à J32 pour les différents groupes. Les résultats sont présentés sous la forme de lésions ostéolytiques en mm² ± SEM. n représente le nombre de souris incluses dans les résultats. L'analyse statistique a été effectuée en réalisant un test de Wilcoxon. Les valeurs de p sont données, en comparaison avec le groupe témoin puis avec le groupe ZOL.

C. Mesure de la masse tumorale et du volume osseux

Le premier paramètre observé concerne le BV/TV (bone volume/total volume). L'analyse histomorphométrique ne montre aucune différence entre le groupe témoin et le groupe C-US (respectivement $20 \pm 1,8$ et $19 \pm 1,5$; $p=0.65$) (**Figure 33-B**). Les souris traitées avec du ZOL ont un BV/TV ($28 \pm 3,0$) statistiquement plus élevé que celles n'ayant pas reçu le BP (**Figure 33-A&B**). L'injection de ZOL permet de prévenir la perte osseuse liée à l'envahissement de la cavité osseuse par les cellules tumorales en comparaison avec le groupe témoin ($p=0.04$) (**Figure 33-A&B**). Au-delà de l'effet du ZOL seul, aucun bénéfice supplémentaire lié au volume osseux n'est apporté par l'application unique ou répétée du traitement C-US (respectivement $28 \pm 3,0$ et $29 \pm 1,5$; $p=0.93$ et $p=0.43$ en comparaison avec le groupe ZOL) (**Figure 33-B**).

Le deuxième paramètre concerne la mesure des masses tumorales rapportée au volume total de tissu mou (TB/STV). Cette analyse permet de montrer que le traitement C-US seul appliqué quotidiennement n'a aucun effet sur le volume tumoral en comparaison avec le groupe témoin (respectivement $62 \pm 4,6$ et $58 \pm 4,5$; $p=0.35$). L'injection seule de ZOL ne permet pas de diminuer statistiquement la masse tumorale par rapport au groupe témoin ($46 \pm 7,6$; $p=0.10$) (**Figure 33-A&B**) même si une baisse du volume tumoral est relevée. Celle-ci peut s'expliquer indirectement par la baisse de l'activité de résorption des ostéoclastes. L'os étant moins détruit, il y a moins de facteurs de croissance et de calcium disponibles pour stimuler la prolifération tumorale, au sein du cercle vicieux. Un traitement unique C-US combiné avec du ZOL n'a pas d'impact sur le volume tumoral ($32 \pm 9,7$; $p=0.48$ par rapport au groupe ZOL) (**Figure 33-B**). Des traitements C-US appliqués quotidiennement et associés à une dose unique de ZOL diminuent de manière significative la masse tumorale par rapport au groupe ZOL ($11 \pm 3,0$; $p<0.01$) (**Figure 33-A&B**). Ces résultats montrent qu'au-delà de son rôle dans la préservation du tissu osseux, le ZOL a une action antitumorale lorsqu'il est associé à un traitement C-US appliqué quotidiennement durant 14 jours.

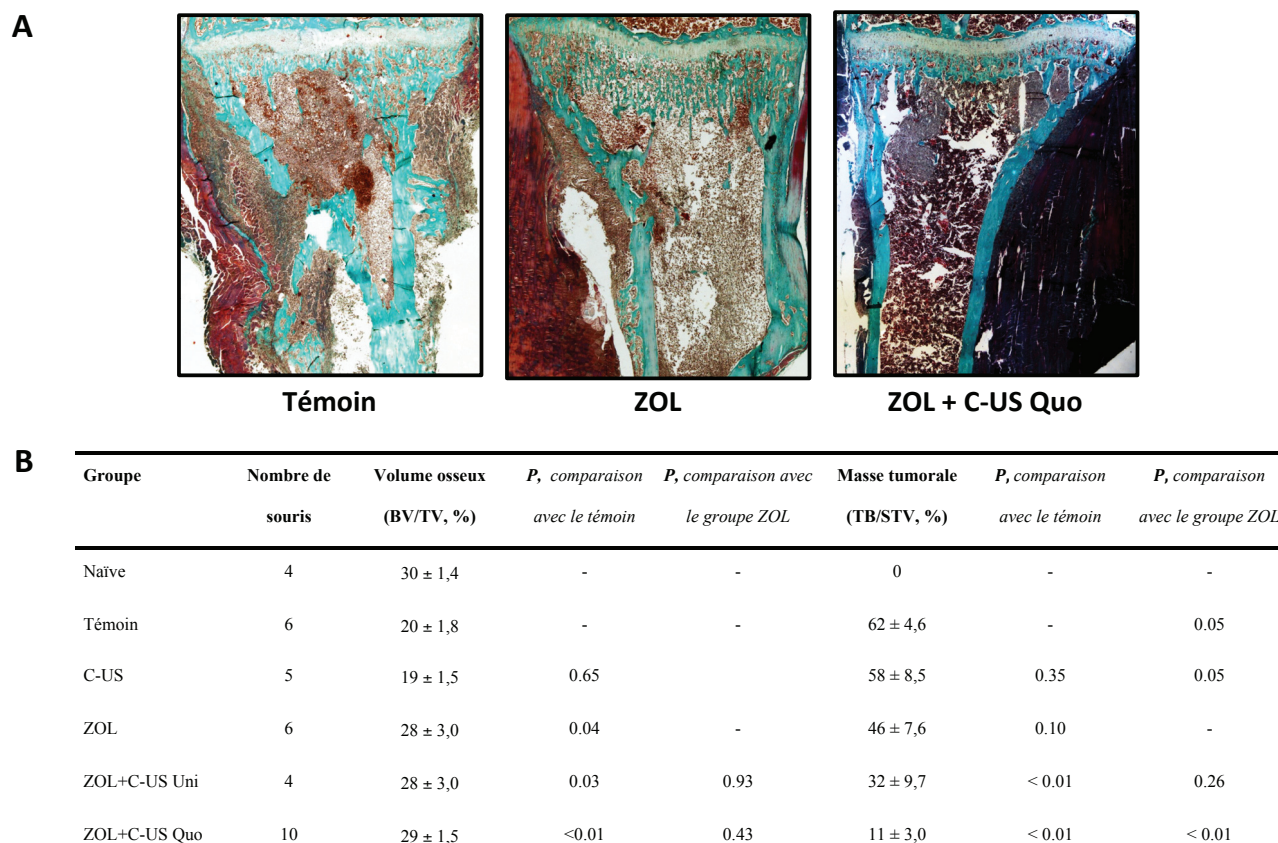


Figure 33 : Evaluation de la masse tumorale au sein de la cavité osseuse

(A) Coupes histologiques colorées au trichrome de Goldner. L'os minéralisé apparaît en vert, la moelle osseuse en violet foncé, les cellules tumorales en marron. Le muscle est rouge ou violet foncé. Chaque image est prise de façon à ce que la plaque de croissance soit apparente. (B) Mesures du volume osseux (BV) par rapport au volume total (TV) en % et de la masse tumorale (TB) par rapport au volume de tissu mou (STV) également en %. Les valeurs de BV/TV et TB/STV pour une souris dite « naïve » (sans métastases, sans traitement) sont données à titre indicatif. C-US : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement, ZOL : zolédronate, ZOL + C-US Uni: Traitement ultrasonore appliqué une seule fois après l'injection de ZOL, ZOL + C-US Quo : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement après l'injection du ZOL. Les tests statistiques sont réalisés en comparaison avec le groupe témoin et le groupe zolédronate seul. Le niveau de significativité a été fixé à 0,05.

D. Effets sur l'activation des ostéoclastes

L'activation des ostéoclastes a été évaluée sur les coupes histologiques par un marquage enzymatique et également par un dosage sérique par ELISA de TRAcP 5b. L'activité ostéoblastique a été mesurée *in situ* et les résultats sont obtenus après avoir mesuré la surface des ostéoclastes activés, colorés en violet foncé (positifs à l'enzyme TRAP), rapportée à la surface osseuse en contact avec la masse tumorale. L'activité TRAP, pour les souris formant le groupe témoin, est d'environ 31% (**Figure 34-A&B**). Cette activité n'est pas significativement différente dans le groupe C-US ($p=0.20$). Ce résultat est confirmé par le dosage sérique TRACP 5b qui confirme que les souris appartenant aux groupes témoin et C-US présentent une activité ostéoclastique similaire ($p=0.20$) (**Figure 34-C**). Un effet lié à

l'injection de ZOL a été mise en évidence avec une activité ostéoclastique réduite d'environ 50% sur les coupes histologiques des tibias de souris appartenant aux groupes ZOL, ZOL + C-US Uni et ZOL + C-US Quo. Ce résultat est confirmé par le dosage sérique ($p=0.04$) (**Figure 34-C**). Aucune différence significative n'a été observée lorsque les traitements C-US appliqués quotidiennement ou une seule fois ont été combinés avec une injection de ZOL ($p>0.05$) (**Figure 34-B&C**). Ainsi, seule l'action du ZOL permet de diminuer l'activité ostéoclastique par rapport à des souris du groupe témoin. Aucun effet sur l'activité ostéoclastique n'a été mis en évidence suite à l'application du traitement ultrasonore.

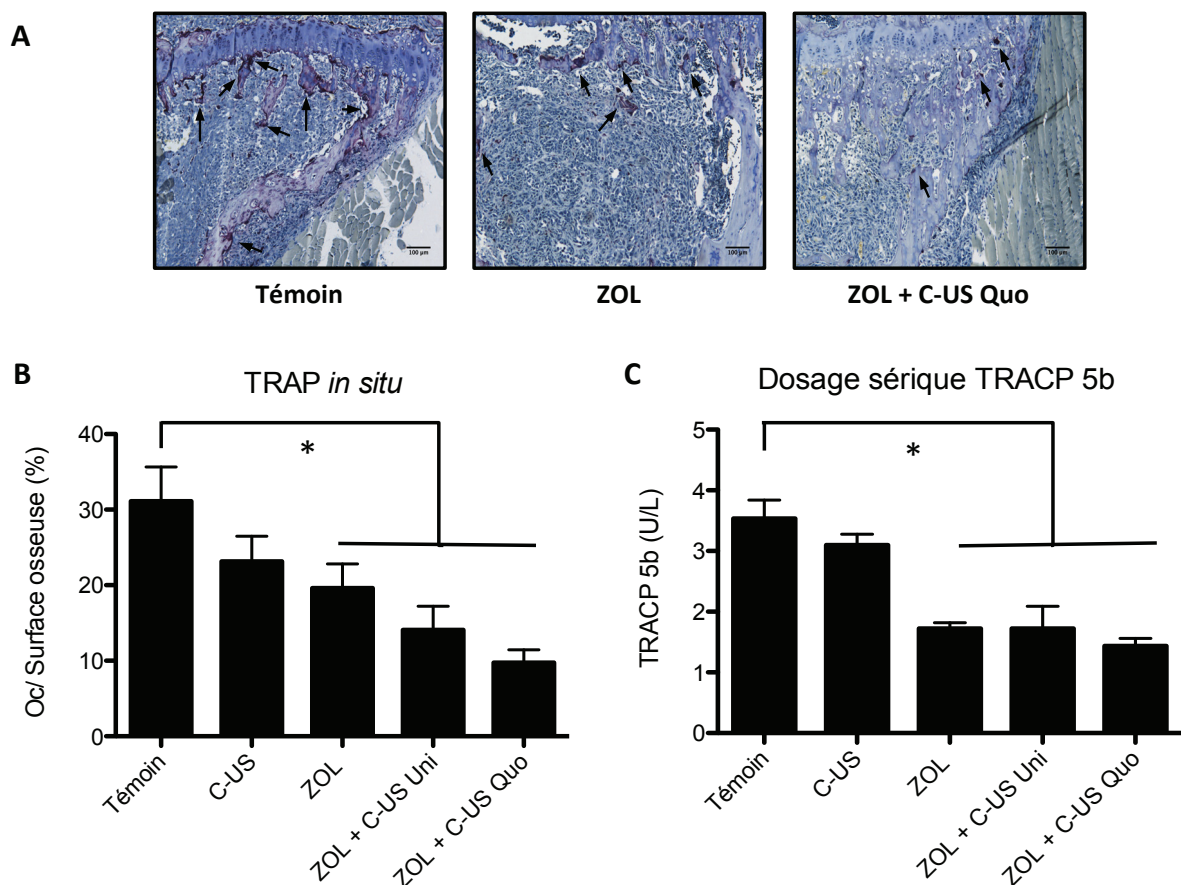


Figure 34 : Mesure de l'activité ostéoclastique

(A) Marquage enzymatique TRAP réalisé sur des coupes de tibias. Les ostéoclastes actifs apparaissent en violet foncé et sont annotés par des flèches. (B) Quantification de l'activité enzymatique TRAP. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio entre les surfaces des ostéoclastes actifs rapportées aux surfaces osseuses en contact avec la tumeur. (C) Dosage TRACP 5b sérique réalisé par dosage ELISA. Les résultats sont présentés sous la forme d'un ratio entre l'intensité lumineuse détectée par litre de sérum. C-US : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement, ZOL : zolédronate, ZOL + C-US Uni: Traitement ultrasonore appliqué une seule fois après l'injection de ZOL, ZOL + C-US Quo : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement après l'injection du ZOL. $p=0,05$. * : $p<0.05$.

E. Prolifération des cellules tumorales et angiogenèse

La vascularisation des tumeurs a été évaluée par immunohistochimie dans les pattes postérieures des souris. Le ZOL seul ou les C-US seuls ne diminuent pas significativement la vascularisation des tumeurs par rapport au groupe témoin (respectivement 115 ± 45 et 115 ± 78 vaisseaux/mm²; $p=0.70$ dans les deux cas par rapport au groupe témoin) (**Figure 35-A**). De même, un traitement C-US appliqué une seule fois après l'injection de ZOL ne permet pas de diminuer de manière significative la densité de vaisseaux sanguins (134 ± 58 vaisseaux/mm²; $p=0.50$ en comparaison avec le groupe ZOL) (**Figure 35-A**). En revanche, le ZOL couplé à des C-US quotidiens permet de diminuer de manière significative le nombre de vaisseaux par rapport à tous les autres groupes et en particulier par rapport au groupe ZOL seul (29 ± 16 vaisseaux/mm²; $p<0.001$) (**Figure 35-A**).

La prolifération des cellules tumorales a également été évaluée par immunohistochimie. L'analyse montre qu'un traitement unique au ZOL ne permet pas de diminuer la prolifération des cellules tumorales dans la cavité osseuse en comparaison avec le groupe témoin (respectivement l'index Ki-67 vaut 26 ± 5 et 43 ± 10 ; $p=0.30$) (**Figure 35-B**). De même, les traitements C-US seuls ne diminuent pas l'index Ki-67 par rapport au groupe témoin (26 ± 7 ; $p=0.15$) (**Figure 35-B**). Aucun bénéfice n'a été mis en évidence entre le groupe ZOL et le groupe associant ZOL et C-US unique ($p=0.85$) (**Figure 35-B**). Il est en revanche à noter que les C-US appliqués quotidiennement et associés à une injection de ZOL, permettent de diminuer d'environ 70% la prolifération des cellules tumorales par rapport au groupe ZOL ($p<0.05$) et de plus de 80% par rapport au groupe témoin ($p=0.01$) (**Figure 35-B**). Ainsi, la diminution de l'angiogenèse et de la prolifération des cellules tumorales apparaît comme deux hypothèses pouvant expliquer la baisse du volume tumoral observé dans le groupe associant ZOL et C-US quotidiens.

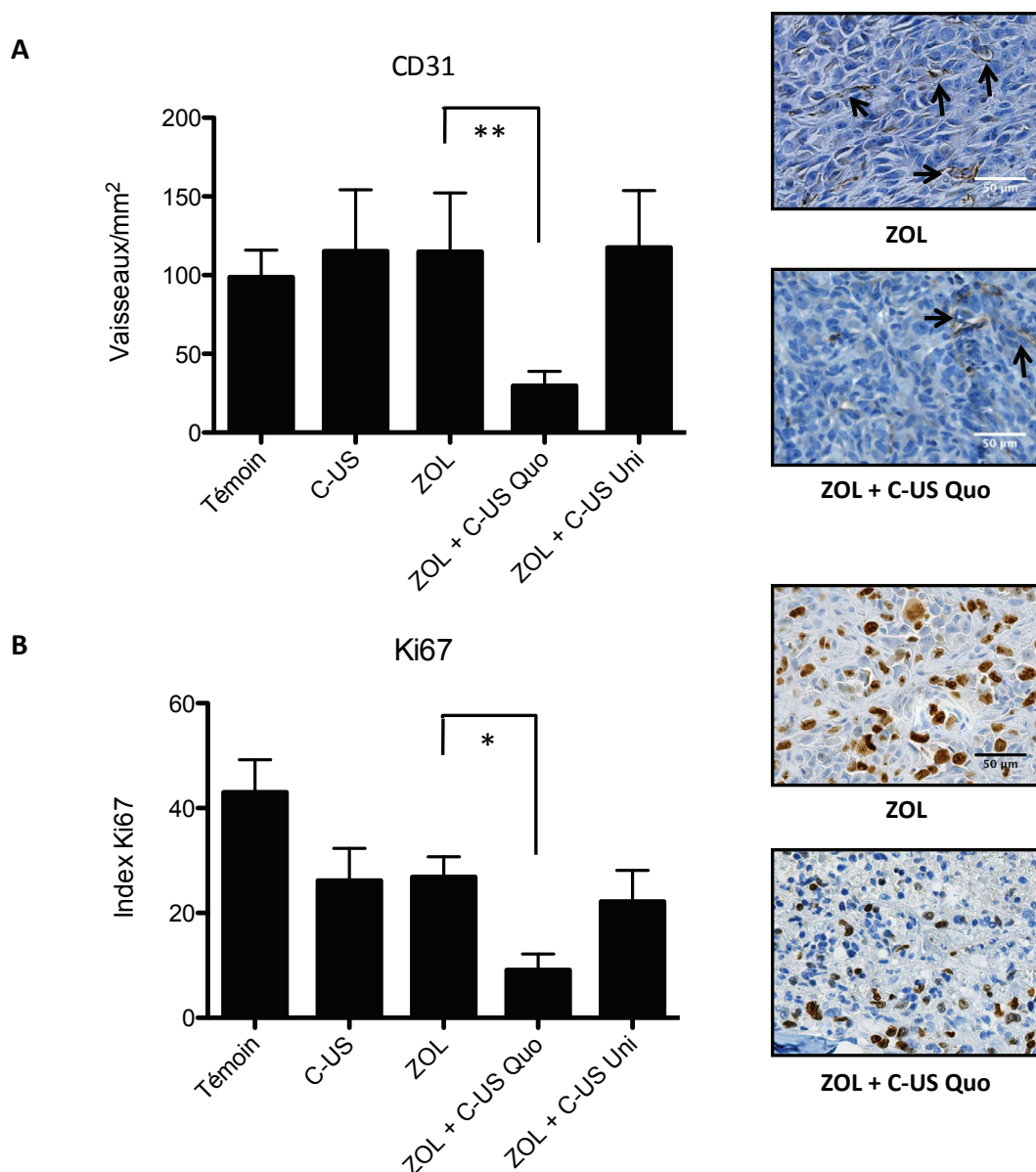


Figure 35 : Angiogenèse et prolifération tumorale après un traitement au ZOL + C-US

L'analyse immuno-histochimique est réalisée sur les tibias des pattes métastatiques. (A) Analyse immuno-histochimique du marquage CD31. Les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins sont marquées en marrons alors que les cellules tumorales apparaissent en bleu. Les vaisseaux, identifiés par des flèches, sont comptabilisés et rapportés à la surface tumorale. **: $p < 0.01$. (B) Analyse immuno-histochimique du marquage Ki-67. Les cellules qui prolifèrent (dites Ki +) apparaissent en marron, les cellules quiescentes (dites Ki -) sont marquées en bleu. L'index Ki-67 est calculé sous la forme d'un pourcentage en rapportant les cellules Ki+ au nombre de cellules totales. C-US : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement, ZOL : zolédronate, ZOL + C-US Uni: Traitement ultrasonore appliqué une seule fois après l'injection de ZOL, ZOL + C-US Quo : Traitement ultrasonore appliqué quotidiennement après l'injection du ZOL. $\alpha = 0,05$. * : $p < 0,05$.

F. Evaluation de la forme non prénylée de Rap1A dans la cavité médullaire

L'accumulation de la forme totale et non-prénylée de Rap1A dans les extraits de moelle osseuse a été évaluée par Western Blot. Aucune variation entre les trois groupes n'a été notée concernant la forme totale de Rap1A. Aucune accumulation de la forme non-prénylée

de Rap1A n'a été retrouvée dans les cellules des moelles osseuses des groupes témoin et ZOL contrairement au groupe ZOL+C-US Quo (**Figure 36**). Ces cellules peuvent être non seulement des cellules tumorales mais également des cellules mésenchymateuses de la moelle, l'anticorps utilisé ne permettant pas de différencier les deux. Cette donnée indique que le ZOL, sous l'effet d'un traitement C-US, a pu davantage pénétrer dans les cellules de la moelle osseuse et ainsi bloquer l'activité de la FPP synthase.

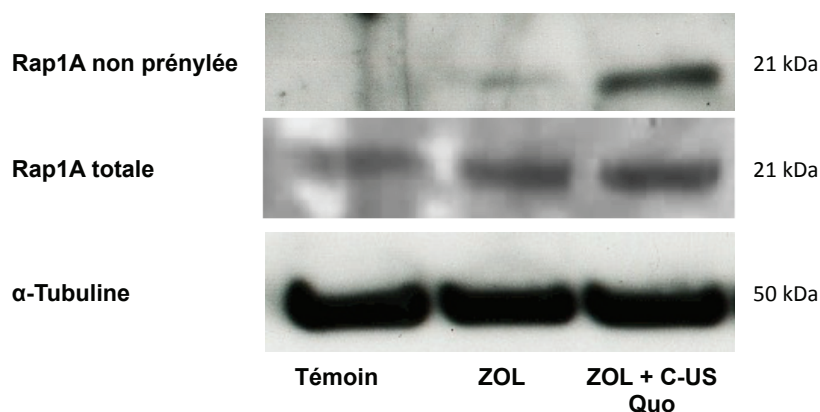


Figure 36 : Western Blot dans les extraits de moelle osseuse.

Un Western Blot a été réalisé sur les extraits protéiques de la moelle osseuse de 3 échantillons représentatifs des groupes témoin, zolédronate seul (ZOL) et zolédronate combiné à un traitement C-US appliqué quotidiennement (ZOL+C-US). La tubuline est considérée comme la protéine contrôle, prouvant que la même quantité de protéines a été déposée pour chaque échantillon. Les valeurs des poids moléculaires sont indiquées.

G. Mesure de la quantité de BP liée à l'os

La quantité de BP liée à l'os a été mesurée à la fin d'une série de traitements aux C-US. Pour cela, du risédronate couplé à de la fluorescéine (FAM-RIS) a été utilisé. L'intensité de fluorescence ainsi que les surfaces marquées par la fixation du BP sont les deux paramètres qui ont été étudiés. Une diminution de 55% a été observée concernant l'intensité de fluorescence (IDV/BV) chez les animaux traités par C-US appliqués quotidiennement en combinaison avec le BP fluorescent (BP + C-US) en comparaison avec des animaux ayant uniquement reçu le BP fluorescent ($p < 0.04$) (**Figure 37-A&B**). De même, les surfaces marquées par la fluorescence sont significativement plus faibles chez les animaux du groupe BP + C-US en comparaison avec les animaux du groupe BP ($p < 0.03$) (**Figure 37-B**). Ainsi, le traitement C-US appliqué tous les jours favorise la désorption du BP hors du minéral osseux, le rendant ainsi de nouveau circulant. Cette expérience permet d'expliquer les résultats obtenus précédemment : le BP étant plus facilement libéré sous l'effet des US, il est alors plus disponible pour les cellules tumorales. L'hyperthermie modérée et la stimulation

mécanique associées à l'action des C-US favorisent d'autant plus la pénétration du BP pour les cellules de la moelle osseuse.

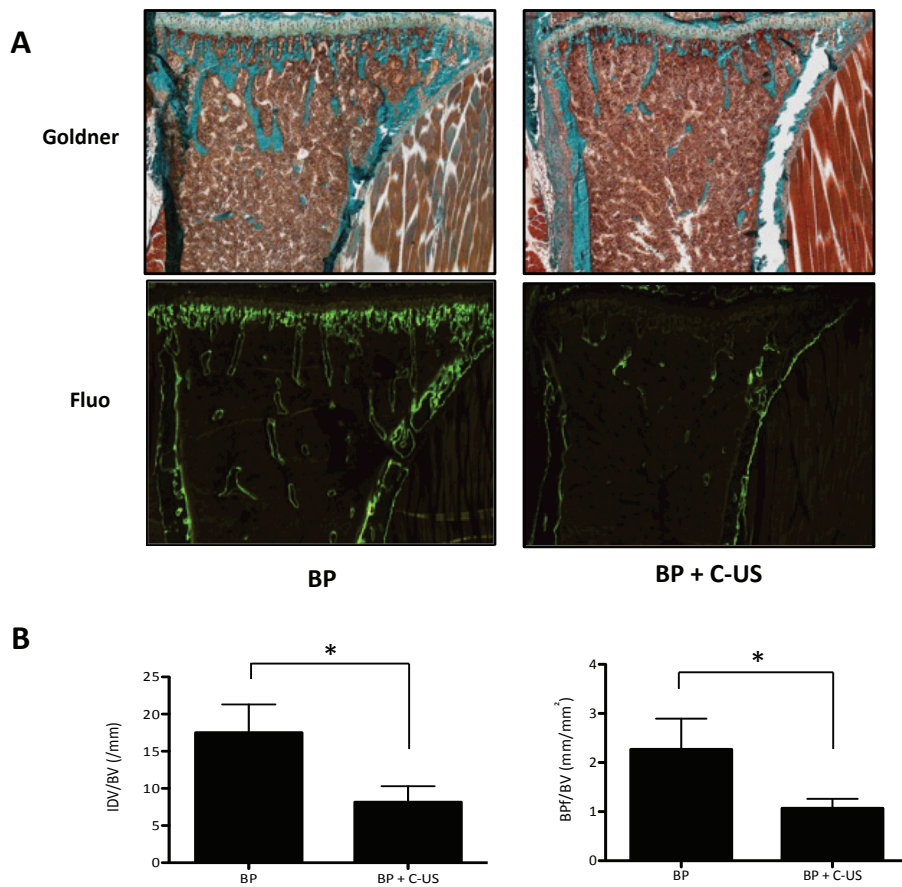


Figure 37 : Quantification du FAM-RIS lié à l'os après un traitement C-US

Les souris ont reçu une injection de FAM-RIS (risédronate couplé à la fluorescéine ; BP). Elles ont été traitées quotidiennement avec des C-US pendant 13 jours. Les pattes ont été prélevées, incluses dans une résine de méthylmétacrylate. Des coupes histologiques de 7 μ m ont ensuite réalisées. (A) Une coloration de Goldner (*panel Goldner*) a été réalisée ainsi qu'une visualisation au microscope à épi-fluorescence (*panel Fluo*). (B) L'intensité de fluorescence (IDV) est mesurée automatiquement par un programme mis en place sur le logiciel ImageJ. Cette valeur est rapportée à la mesure du volume osseux (BV, en mm³). Le résultat se présente sous la forme d'un ratio entre l'intensité de fluorescence rapportée au volume osseux (IDV/BV en mm⁻¹). Les surfaces marquées (BPf; en mm) sont également mesurées par un programme développé sur ImageJ. Cette valeur est rapportée à la mesure du volume osseux (BV, en mm³). Le résultat se présente sous la forme d'un ratio entre les surfaces marquées par le BP fluorescent et le volume osseux (BPf/BV ; mm⁻¹). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism. Un test bilatéral de Wilcoxon a été utilisé avec une significativité fixée à 0,05. * : $p < 0.05$.

Les deux expériences précédentes ont démontré que les US pouvaient favoriser la libération du BP et pénétrer ainsi davantage dans les cellules de la moelle osseuse. Compte tenu de ces deux informations, nous nous sommes interrogés sur la capacité des C-US à libérer le BP et à agir sur une tumeur localisée à distance du site osseux.

H. Effets des C-US dans l'évolution de tumeurs sous-cutanées

Dans ce protocole, les traitements ont été appliqués sur les animaux uniquement lorsque le volume tumoral avait atteint une valeur proche de 30 mm³ afin d'obtenir la meilleure pertinence sur les analyses comparatives. Ainsi, il n'y avait aucune différence significative sur les volumes tumoraux au premier jour des traitements ($p>0.05$) (**Figure 38-A**). Huit jours après le début des traitements (J8), les volumes tumoraux mesurés dans les groupes ZOL et C-US sont similaires à ceux mesurés dans le groupe témoin (**Figure 38-A**). Le volume tumoral moyen mesuré dans le groupe recevant une injection de ZOL puis un traitement C-US appliqué quotidiennement (ZOL + C-US Quo) est significativement plus faible à J8 par rapport au groupe témoin ($p<0.05$) et au groupe ZOL ($p<0.01$) (**Figure 38-A**). Le poids des tumeurs à J8 est également réduit de 34% dans le groupe ZOL+C-US Quo en comparaison avec le groupe ZOL ($p=0.03$) (**Figure 39-A**). Cette diminution est accompagnée par une baisse de l'angiogenèse par rapport au groupe témoin ($p=0.03$) et par rapport au groupe ZOL ($p=0.04$) (**Figure 38-B**). L'index Ki-67 est également plus faible dans le groupe ZOL + C-US par rapport au groupe témoin ($p=0.03$) (**Figure 38-B**). A J15, le volume tumoral moyen du groupe ZOL + C-US Quo est statistiquement plus faible par rapport au groupe témoin ($p<0.05$) et par rapport au groupe ZOL ($p<0.05$) (**Figure 38-A**). Cependant, aucune différence significative n'est mise en exergue concernant l'index Ki-67 (**Figure 38-B**).

La prénylation de Rap1A, marqueur de la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales, a été évaluée par Western Blot. Une accumulation de la forme non prénylée de Rap1A à J8 est démontrée uniquement pour les groupes ZOL+C-US Quo (**Figure 38-C**). En revanche, l'accumulation de la forme non prénylée de Rap1A n'a pas été observée à J15 (**Figure 38-C**). Aucune différence significative n'a été observée sur la forme totale de Rap1A entre les différents groupes (**Figure 38-C**).

Ainsi, une dose unique de ZOL associée à un traitement C-US quotidien permet de stopper la croissance tumorale jusqu'à J8 comme le démontre la diminution de l'angiogenèse, de la prolifération des cellules tumorales et de l'accumulation de la forme non prénylée de Rap1A. L'effet antitumoral observé ne persiste cependant pas jusqu'à J15 : une augmentation plus prononcée du volume tumoral a été observée entre J12 et J15. Aucune différence significative n'a été observée sur le poids des tumeurs mesuré à J15 entre les groupes témoin, ZOL et C-US ($p>0.05$) (**Figure 39-B**), suggérant que le traitement ZOL+C-US est moins efficace entre J8 et J15.

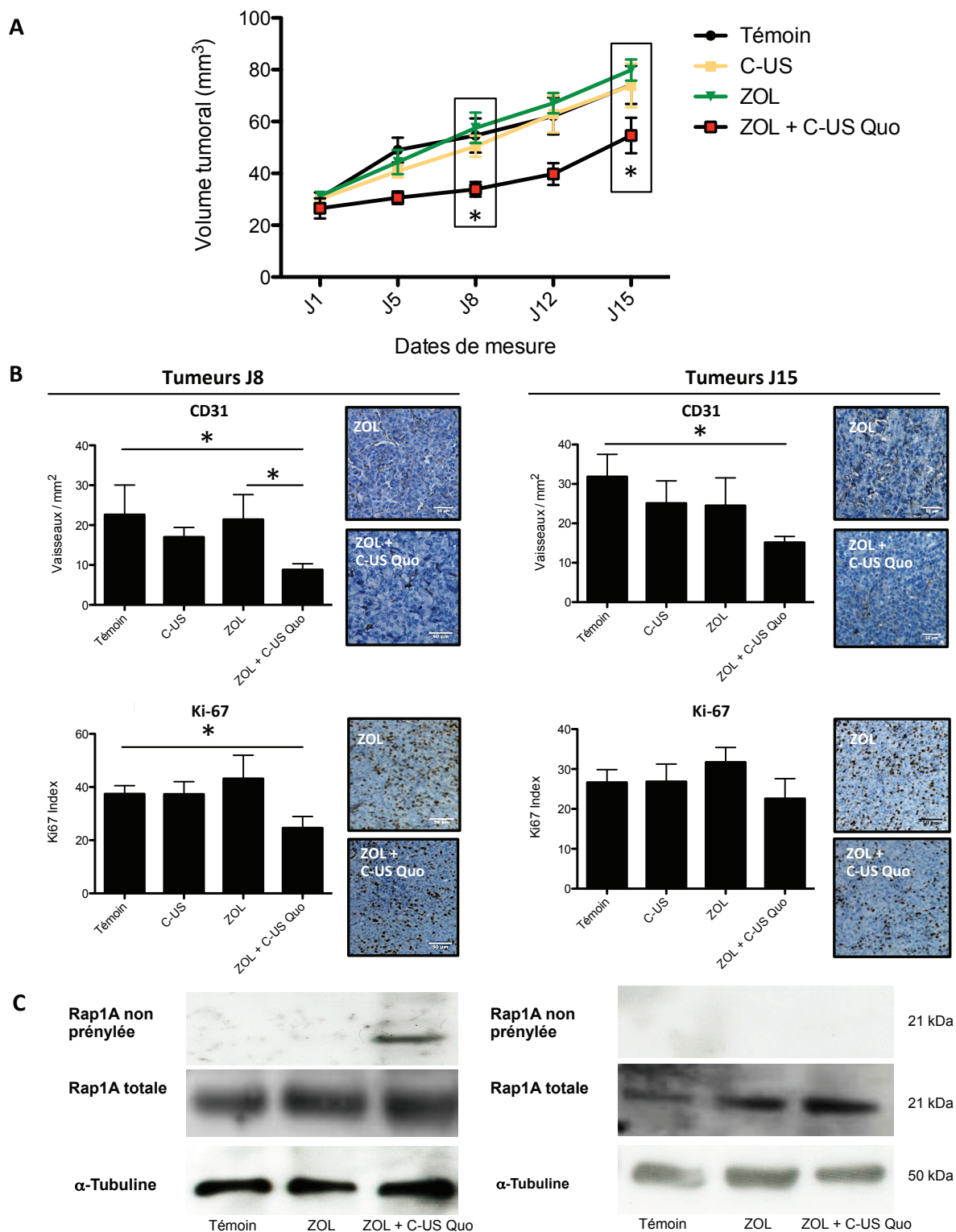


Figure 38 : Effet des C-US associés au ZOL sur des tumeurs sous-cutanées

(A) : Evolution du volume tumoral entre J1 et J15 pour les groupes témoin, zolédronate seul (ZOL) et ZOL combiné à un traitement C-US quotidien (ZOL+C-US Quo). * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$. (B) : Analyse immuno-histochimique réalisée sur les tumeurs à J8 (panel de gauche) et J15 (panel de droite). La densité de vaisseaux sanguins approvisionnant la tumeur est évaluée avec un anticorps anti-CD31. La prolifération des cellules tumorales est attestée par la détermination de l'index Ki-67. Une image représentative des marquages CD31 et Ki-67 obtenus pour les groupes ZOL et ZOL + C-US Quo est présentée sur la droite de chaque histogramme. (C) : Western Blot réalisé sur des extraits tumoraux. La forme non prénylée et la forme totale de Rap1A sont présentées ainsi que la tubuline comme un contrôle de la quantité de protéines déposées.

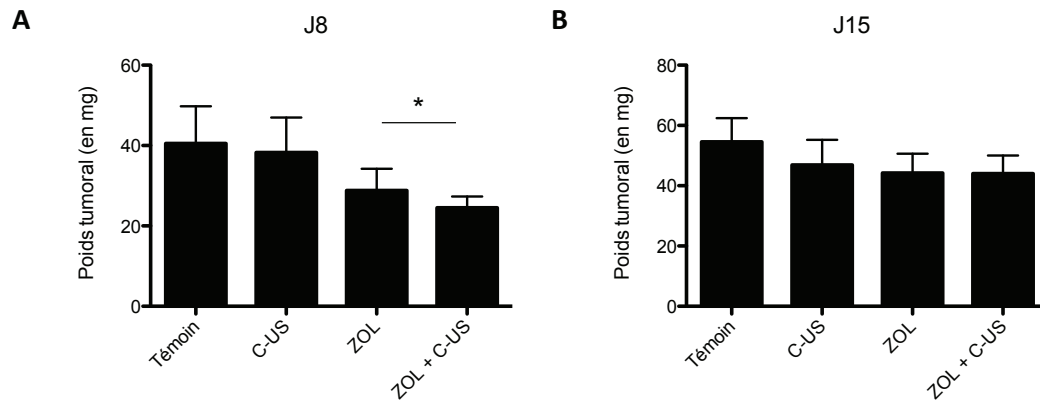


Figure 39 : Poids des tumeurs sous-cutanées après un traitement au ZOL + C-US

(A) : Mesures réalisées à J8 et (B) : Mesures réalisées à J15. . L'analyse statistique a été réalisée avec un test de Wilcoxon. * : $p < 0.05$. $\alpha = 0.05$.

IV) CONCLUSION

Cette étude montre qu'une seule dose de ZOL considérée comme cliniquement pertinente produit des effets anti-tumoraux significatifs dans des modèles animaux de tumeur du sein sous-cutanée et de métastases osseuses seulement lorsque les souris ont été traitées quotidiennement par C-US en plus de la dose de ZOL. En accord avec les résultats antérieurs (257), les souris métastatiques traitées avec une dose clinique de ZOL présentent une destruction osseuse et une charge tumorale moindre par rapport aux souris du groupe témoin. Cette réduction de la charge tumorale peut résulter de l'activité indirecte du ZOL : en effet, la destruction de l'os favorise la libération de facteurs de croissance, en particulier le TGF- β et l'IGF-1 qui peuvent à leur tour stimuler la prolifération des cellules tumorales (25). En inhibant l'activité des ostéoclastes, le ZOL réduit la destruction osseuse ce qui prive, en retour, les cellules tumorales de ces facteurs nécessaires à leur prolifération (68). Toutefois, la réduction supplémentaire de la charge tumorale, observée lorsque le ZOL est combiné aux C-US, souligne l'existence d'un autre mécanisme. Lors de l'utilisation d'un traitement combiné ZOL et C-US, une accumulation de la forme non prénylée de Rap1A a été détectée dans les moelles des animaux. Cette accumulation témoigne de l'absorption cellulaire de ZOL et de l'inhibition subséquente de l'activité de la FPP synthase. Ainsi, la pénétration du ZOL dans les cellules de la moelle osseuse a été favorisée sous l'effet des C-US. Compte tenu de ces résultats, il semble que les C-US induisent des effets mécaniques en plus de l'hyperthermie susceptibles de favoriser la pénétration du ZOL dans des tumeurs *in vivo*. Le stress mécanique inclut la pression de radiation, les micro-courants, les ondes stationnaires et les ondes de Lamb qui se propagent le long de surfaces solides telle que les os (254). Ces contraintes mécaniques sont probablement responsables de la libération du BP

fluorescent. En extrapolant ces résultats obtenus avec un BP fluorescent à l'utilisation du ZOL lors de ces manipulations, les C-US peuvent permettre une imprégnation en continu de la moelle osseuse avec de faibles concentrations de BPs, qui vont entraver la croissance tumorale. Cette observation est corroborée par la diminution de l'angiogenèse et de la prolifération des cellules tumorales pour les souris traitées par ZOL + C-US.

Par ailleurs, il a été montré que les tumeurs du sein primaires recrutaient des progéniteurs des cellules endothéliales de la moelle qui se différencient ensuite en cellules endothéliales matures et contribuent à la vascularisation de ces tumeurs (257). Les BPs présentent des propriétés anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* en réduisant les phénomènes d'angiogenèse (148). La libération du ZOL du minéral osseux par les traitements C-US est donc susceptible d'interférer avec la vascularisation des tumeurs du sein. Pour répondre à cette hypothèse, des expériences ont été menées sur des souris portant des tumeurs mammaires implantées par voie sous-cutanée. Les résultats ont montré que les traitements C-US en combinaison avec une dose unique de ZOL ont inhibé la croissance de la tumeur par rapport aux groupes recevant uniquement le ZOL. En outre, la réduction de la croissance tumorale est corrélée à une réduction de l'angiogenèse ainsi qu'à une diminution de la prolifération des cellules tumorales. Une accumulation accrue de la forme non prénylée de Rap1A a également été observée dans les tumeurs sous-cutanées, démontrant la pénétration de ZOL au sein de ces tumeurs.

La moelle osseuse est également connue pour être un réservoir de cellules myéломocytaires CD11b+ (148). Ces cellules peuvent infiltrer les tumeurs distantes et contribuer ainsi à leur vascularisation en produisant la métalloprotéase-9 (MMP-9), qui à son tour, favorise la libération de VEGF de la matrice extracellulaire (259). Il a été précédemment montré *in vivo* qu'un traitement avec des doses fractionnées de ZOL (0,1 mg/kg/jour pendant 4 semaines) inhibait l'infiltration de cellules myéломocytaires CD11b + dans les tumeurs mammaires de souris (259). Dans le cadre des travaux décrits dans ce chapitre, il est probable que le ZOL (0,1 mg/kg) minéralisé dans l'os suite à une injection unique ait été libéré progressivement de la matrice osseuse par les traitements C-US, inhibant ainsi l'infiltration de cellules CD11b + dans les tumeurs. De même, le ZOL, plus disponible, a également pu interférer avec le recrutement de progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse. Cependant, l'effet antitumoral visible à J8 disparaît au fil du temps avec une reprise de la croissance tumorale observée à J12. Il est très probable que les concentrations de ZOL libérées du minéral osseux (lors d'un traitement C-US) aient diminué

progressivement, pour finalement être trop faibles pour être efficace sur l'inhibition de la croissance tumorale à distance de l'os.

Ces résultats font écho à ceux observés dans l'utilisation clinique des BPs comme thérapie adjuvante des cancers du sein. Des essais cliniques de phase III ont montré que la prescription de ZOL en plus d'un traitement hormonal ou chimiothérapeutique améliorait la survie sans maladie des patientes ménopausées ou sous suppression ovarienne (68). Par exemple, l'essai ABCSG-12 a montré que l'ajout de ZOL à une hormonothérapie pendant 3 ans améliorait la survie sans récurrence de 84 mois avec également une réduction significative du risque de décès (68). Cet effet du ZOL se retrouve dans les données expérimentales présentées dans ce chapitre. La libération de ZOL à partir de l'os (soit naturellement, soit induite par les C-US) permet une imprégnation en continu de la moelle osseuse ce qui peut entraver la rétention des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse et/ou priver les tumeurs des facteurs de croissance dérivés de l'os et des cellules myélomonocytaires ainsi que des progéniteurs des cellules endothéliales. Ainsi, les traitements C-US pourraient représenter une stratégie efficace pour améliorer la pénétration de BP dans les tumeurs. D'autres études cliniques ont proposé un traitement avec du ZOL concomitant à une chimiothérapie néo-adjuvante pour améliorer la réponse complète chez des patientes atteintes de cancer du sein, par rapport à une chimiothérapie seule (162). Il est donc concevable que le traitement C-US soit applicable aux tumeurs du sein chez des patientes recevant une chimiothérapie néo-adjuvante avec du ZOL pour améliorer le taux de réponse et en particulier retarder ou éviter l'apparition des métastases osseuses.

En conclusion, ces résultats démontrent le potentiel des C-US comme une stratégie efficace pour forcer la désorption d'un BP de l'os et permettre sa pénétration dans une tumeur située au niveau de l'os ou à distance. Ces résultats supportent l'hypothèse d'associer le ZOL à un traitement du cancer du sein.

CHAPITRE 4

Utilisation des ultrasons de faible intensité dans un modèle tumoral mammaire en situation néo-adjuvante

I) CONTEXTE CLINIQUE

L'intérêt visant à utiliser le ZOL en situation néo-adjuvante repose sur trois idées. La première découle de l'hypothèse dite du « seed and soil » émise par Stephan Paget en 1889 : une métastase (« la graine ») naît de l'interaction favorable avec le milieu cible (« le sol ») (« seed and soil theory ») (24). Ainsi, une action visant à rendre le terrain moins favorable à la dissémination semble aussi utile qu'une action visant à détruire les « graines » en elles-mêmes. Le deuxième argument repose sur l'ensemble des données pré-cliniques démontrant l'activité anti-tumorale des BP. Leur spectre d'activité est large : ils agissent notamment sur l'invasion, la migration, l'adhésion et la prolifération des cellules tumorales (148). Des études précliniques et cliniques ont démontré qu'ils agissent en synergie avec des chimiothérapies (260) ou des hormonothérapies (261). Ils stimulent également la réponse immunitaire anti-tumorale (151). Enfin, des données cliniques ont montré que leur administration entraînait une diminution du nombre de cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse (262) et un probable effet anti-tumoral en situation pré-opératoire (162). Plusieurs essais cliniques ont été menés et présentent des résultats controversés. L'étude AZURE n'a démontré aucun effet sur la survie des patientes. Cependant, l'étude d'une sous-population composée de femmes ménopausées, a montré que le ZOL conférait un bénéfice sur la survie globale et sans récurrence. Ce résultat a été confirmé par les essais ZO-FAST et ABCSG-12 où la ménopause était soit acquise avant le début du traitement soit induite par suppression ovarienne chimique. Le bénéfice de cette association est encore discuté et mal compris mais une nouvelle indication des BPs pourrait émaner de ces recherches. Dans ce contexte, l'utilisation d'US pourrait être appropriée. Les études précédentes démontrent que les US de faible intensité potentialisent l'effet anti-tumoral du ZOL et pourraient ainsi conférer un bénéfice à l'association entre chimiothérapie et BP. Ce chapitre présente une étude préliminaire consistant à évaluer l'intérêt d'un traitement ultrasonore dans une situation néo-adjuvante de cancer du sein. Cette étude se divise en deux parties : la première a été réalisée sur des cultures cellulaires, la seconde met en jeu un modèle murin de tumeur mammaire.

II) MATERIEL ET METHODES

A. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire eucaryote 4T1 a été cultivée à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Life Technologies) a été utilisé et complété avec du sérum de veau fœtal (SVF, 10%, Lonza) et des antibiotiques (pénicilline/streptomycine, 1%, GE Healthcare). Cette lignée a été utilisée pour les études *in vitro* et *in vivo* présentées dans ce chapitre.

B. La doxorubicine

La doxorubicine (Dox) est un agent cytotoxique de masse moléculaire de 543 Da. Son usage est largement répandu depuis les années 1970. La Dox appartient à la famille des anthracyclines et est synthétisée par *Streptomyces peucetius*. Son mode d'action n'est pas parfaitement élucidé. *In vitro*, elle pénètre rapidement dans les cellules par diffusion (263) et se lie aux protéasomes dans le cytoplasme. Le complexe ainsi formé est alors transloqué dans le noyau. Une fois dans le noyau, la Dox se dissocie des protéasomes et se lie aux molécules d'ADN, pour lesquelles elle présente une plus forte affinité (264). Son affinité pour l'ADN résulte de l'interaction du groupement amine de la guanine et du groupement hydroxyl de la Dox (-OH) (**Figure 40**).

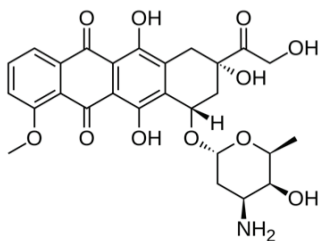


Figure 40 : Structure chimique de la doxorubicine

Lors de la synthèse de l'ARN, la Dox affecte les phases d'initiation et d'élongation. Elle inhibe la synthèse d'ARN en bloquant l'activité de l'ARN polymérase (265). La Dox est également considérée comme un poison pour la topo-isomérase II (266) : elle stabilise le complexe entre cette dernière et l'ADN ce qui génère des cassures dans les brins d'ADN. L'accumulation d'ADN endommagé dans le noyau est cytotoxique pour les cellules (267, 268). La Dox entraîne la formation de radicaux libres et des cassures des brins d'ADN. Enfin, elle inhibe le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Induced Factors-1) ce qui entraîne notamment une diminution de l'expression du VEGF et l'inhibition de la vascularisation des tumeurs (269).

La Dox présente un large spectre d'activité antitumorale dans le traitement de tumeurs solides ou du sang. Elle peut être administrée seule ou en combinaison avec d'autres agents cytotoxiques. Seule, elle induit des taux de rémission complète de près de 38% pour les sarcomes et de 40% pour le cancer de l'endomètre. Elle est surtout associée à d'autres drogues anti-cancéreuses telles le cyclophosphamide, les sels de platine et les taxanes et présente alors des taux de rémission complète proches d'environ 70% pour le traitement de la leucémie myéloïde aiguë, le cancer du sein et la maladie de Hodgkin. La Dox, comme d'autres chimiothérapies, peut être administrée avant une chirurgie afin de réduire le volume de la tumeur avant la résection chirurgicale : on parle de traitement néo-adjuvant. Elle peut être administrée après la chirurgie afin de limiter le risque de rechute et la dissémination métastatique. Afin de limiter la toxicité relative associée à la Dox, l'utilisation de vecteurs a été développée afin de modifier sa distribution. Les liposomes permettent ainsi d'encapsuler la Dox et s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs. Cet effet est relatif à la vascularisation des tumeurs qui présente des pores de taille suffisamment importante (100-780 nm) pour favoriser l'extravasation des liposomes de la circulation systémique à la tumeur.

Son administration est réalisée par voie intraveineuse à la posologie de 60-75 mg/m² tous les 21 jours. Environ 6 cycles de chimiothérapie sont réalisés. Toutefois, la Dox est associée à une forte toxicité cardiaque, induite par son métabolite principal, le doxorubicinol (270). Elle induit fréquemment une dépression médullaire chez les patients. Elle est rapidement éliminée du plasma pour se lier fortement aux tissus. Environ 5% de la dose administrée est retrouvée dans les urines en 5 jours. Environ 50% de la Dox est éliminée par les voies biliaires et fécales en 7 jours.

C. Traitements *in vitro*

Une première étude a été conduite pour déterminer la concentration de Dox conduisant à un taux de pénétration du 7-AAD compris entre 10 et 20% afin de pouvoir discriminer l'effet des différents traitements combinés. Pour cela, les cellules 4T1 ont été mises en présence de concentrations croissantes de Dox (entre 0 et 2000 nM).

Une deuxième étude s'est intéressée à l'effet du ZOL (25 µM) sur la pénétration du 7-AAD. Les cellules ont ainsi été mises en présence de ZOL pendant 24 heures. Dans ces deux cas, l'analyse de la viabilité cellulaire a été effectuée 24 heures après le début du traitement au ZOL ou à la Dox.

La troisième étude a consisté à associer la Dox, le ZOL et des C-US ou des LIPUS afin d'observer leurs effets sur la pénétration du 7-AAD. Les cellules 4T1 ont été comptées etensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm. Elles ont été placées à l'incubateur pendant la nuit (37°C, 5% de CO₂). Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS et placées en présence de Dox diluée (100 nM) dans le milieu de culture et/ou de ZOL (25 µM). Les traitements ultrasonores ont été réalisés après ajout des drogues. La sonde ultrasonore a été placée directement au contact du milieu de culture. Les traitements C-US ou LIPUS ont duré 30 minutes. Les cellules ont ensuite été placées à l'incubateur jusqu'au lendemain.

D. Viabilité cellulaire

Le 7-AAD a été utilisé comme un marqueur de la viabilité cellulaire lors des traitements *in vitro*. Cette technique permet de discriminer les cellules saines et viables de celles dont l'intégrité est compromise. L'étude de la viabilité cellulaire a été effectuée par une analyse en cytométrie de flux. Les cellules ont été lavées au PBS puis décollées avec un traitement à la trypsine (Invitrogen). Elles ont ensuite été comptées et re-suspendues à la concentration de 5x10⁵ cellules dans 200 µL. Puis, 10 µL d'une solution de 7-AAD (BD Biosciences) a été ajouté. Le mélange a été laissé à l'incubation pendant 20 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules ont ensuite été analysées en cytométrie de flux (FACS Canto II, BD Biosciences). Les résultats ont été compilés sur le logiciel FACSDiva.

E. Protocole animal

Afin d'évaluer l'effet de l'association Dox, ZOL et C-US *in vivo*, un modèle animal murin a été utilisé. Ce modèle mime une situation clinique à savoir le développement d'une tumeur mammaire qu'il est possible de réséquer et sa dissémination spontanée à d'autres organes.

1. Modèle orthotopique de tumeur mammaire

Les cellules de la lignée murine 4T1 ont été injectées dans la 4^{ème} glande mammaire de souris Balb c (Charles River, Saint-Germain-Nuelles), âgées de 6 semaines. Les cellules 4T1 présentent la caractéristique de former des tumeurs au niveau de la glande mammaire puis de métastaser spontanément dans d'autres sites secondaires comme les poumons, les os, le cerveau, les ganglions lymphatiques et le foie (271). La prise tumorale est proche de 100% et la résection de la tumeur primaire est possible par chirurgie. L'apparition d'une tumeur de la glande mammaire est visible environ 7 jours après l'injection des cellules tumorales.

2. Synopsis

Après une période d'acclimatation de 7 jours, les souris ont reçu au premier jour du protocole (à J0) une injection de buprénorphine (0,05 mg/kg) par voie sous-cutanée afin de prévenir la douleur relative à l'incision nécessaire à l'injection des cellules tumorales. Les souris ont ensuite été anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine (130 mg/kg) et de rompun (8,8 mg/kg). Elles ont été rasées au niveau du point d'injection. La peau a été désinfectée (Vétédine®, Vétquinol, France) et incisée. L'injection des cellules tumorales a été réalisée directement dans la glande mammaire. L'incision a été refermée par de la colle chirurgicale (Vetbond™, 3M, USA). Les souris ont ensuite été suivies pendant 3 jours afin de vérifier l'évolution de l'incision. A J7, les souris ont été pesées, tondues et épilées sur la zone inférieure au thorax. Les tumeurs ont été mesurées grâce à un pied à coulisse. Les souris ont ensuite été réparties dans les différents groupes de traitement. Le même jour les souris ont reçu une injection unique de Dox (2 mg/kg) (156) réalisée par voie intra-péritonéale. L'injection a été suivie immédiatement d'un traitement C-US selon la même méthode que celle décrite au chapitre 3. Ce traitement a été répété tous les jours jusqu'à J14 inclus. A J8, les souris ont reçu une injection sous-cutanée de ZOL (100 µg/kg). Les souris ont été pesées à J9, J11 et J15 afin d'évaluer la tolérance des traitements. Le volume des tumeurs a été mesuré aux mêmes moments. A J15, et après une injection de buprénorphine, les souris ont été anesthésiées et la tumeur primaire a été retirée (**Figure 41**). Ce protocole a été validé par le comité d'éthique de l'Université Claude Bernard Lyon 1 (DR2014-13).

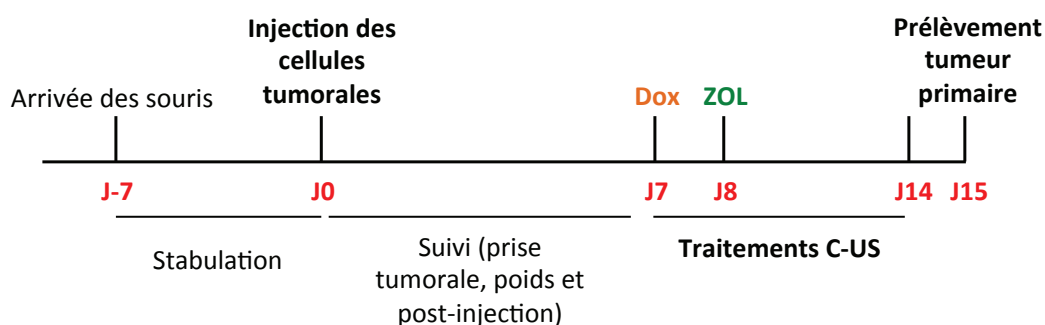


Figure 41 : Synopsis du protocole associant Dox, ZOL et C-US

Les souris ont été maintenues en stabulation pendant une semaine avant toute manipulation. A J0, elles ont reçu une injection de 100 000 cellules tumorales 4T1 dans la glande mammaire. A J7, les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de Dox (2 mg/kg) suivie d'un traitement C-US qui a été répété quotidiennement jusqu'à J14. A J8, elles ont reçu une injection sous-cutanée de ZOL (100 µg/kg). Les tumeurs ont été réséquées à J15.

Les différents groupes de souris constitués ont permis d'évaluer la prise tumorale avec un groupe témoin, l'effet d'un traitement C-US seul, de la Dox seule ou en association avec du ZOL et/ou un traitement C-US, du ZOL seul et/ou un traitement C-US (**Tableau 4**). Afin de réduire le nombre d'animaux, les groupes où les US n'étaient appliqués qu'une seule fois après l'injection de ZOL n'ont pas été reproduits.

Groupe	Dénomination	Effet évalué
Témoin	Témoin	Prise tumorale, dissémination métastatique
Ultrasons continus	C-US	Effet des ultrasons continus seuls
Doxorubicine	Dox	Effet d'une chimiothérapie classique
Doxorubicine + Ultrasons continus	Dox + C-US	Effet d'une chimiothérapie classique associée à des ultrasons continus
Zolédronate	ZOL	Effet du zolédronate seul
Zolédronate + Ultrasons continus	ZOL + C-US	Effet du zolédronate associé à des ultrasons continus
Doxorubicine + Zolédronate	Dox + ZOL	Effet d'une thérapie néo-adjuvante classique
Doxorubicine + Zolédronate + Ultrasons continus	Dox + ZOL + C-US	Effet d'une thérapie néo-adjuvante classique associée à des ultrasons continus

Tableau 4 : Groupes de traitement dans le protocole Dox, ZOL et C-US

3. Histologie

Après avoir été pesées, les tumeurs primaires ont été plongées dans du formol pendant 1 semaine puis incluses en paraffine. Elles ont ensuite été coupées au microtome et fixées sur des lames. Un marquage immuno-histochimique des vaisseaux sanguins (CD31) et de la prolifération tumorale (Ki-67) a été réalisé selon la méthode détaillée dans le chapitre 3.

4. Test statistique

In vitro, un test ANOVA à un seul facteur a été appliqué suivi d'une correction de Tukey afin de comparer la viabilité des cellules selon les différents groupes de traitement. *In vivo*, les

groupes ont été comparés deux-à-deux en utilisant un test de Wilcoxon dont la puissance a été préalablement fixée à 80% et α à 5%. L'analyse statistique a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism (La Jolla, USA).

III) RESULTATS

A. Etude in vitro

1. Détermination de la concentration en Dox

Le traitement de cellules 4T1 avec des doses croissantes de Dox démontre qu'entre 0 et 50 nM, moins de 10% des cellules ont intégré le 7-AAD. Ce pourcentage augmente jusqu'à 12,5 et 16,5 % pour des concentrations allant de 80 à 100 nM. Au-delà de 100 nM, le pourcentage de cellules ayant intégré le 7-AAD augmente fortement pour finalement atteindre 100 % à 400 nM. Ainsi, la concentration en Dox choisie pour le reste des expériences a été fixée à 100 nM car elle permet d'obtenir environ 15% de mortalité cellulaire ce qui permettra ensuite d'évaluer l'apport de traitements combinés (**Figure 42**).

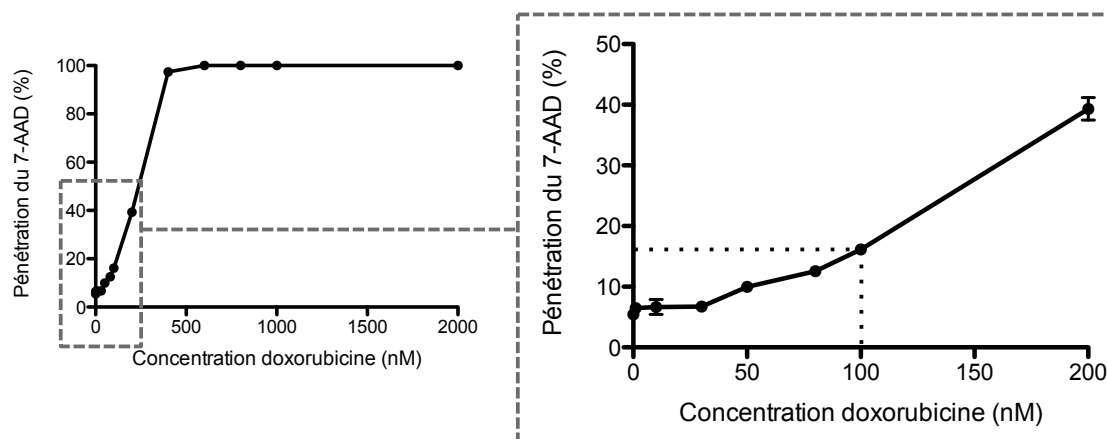


Figure 42 : Pénétration du 7-AAD dans des cellules 4T1 selon la concentration en Dox

Figure de gauche : pénétration du 7-AAD en fonction de concentrations croissantes de Dox, de 0 à 2000 nM.
Figure de droite : Zoom de la figure précédente sur une plage allant de 0 à 200 nM pour la concentration en Dox. Les résultats sont donnés sous la forme d'une moyenne \pm SEM.

2. Effets du ZOL sur la viabilité des 4T1

La dose de ZOL utilisée (25 μ M) n'entraîne pas d'augmentation de la pénétration du 7-AAD. Le pourcentage de cellules traitées au ZOL ayant intégré le 7-AAD est similaire à celui obtenu pour des cellules traitées avec du PBS (Témoin). Ainsi, le ZOL, à la concentration de 25 μ M et incubé pendant 24h n'entraîne pas de mort cellulaire (**Figure 43**).

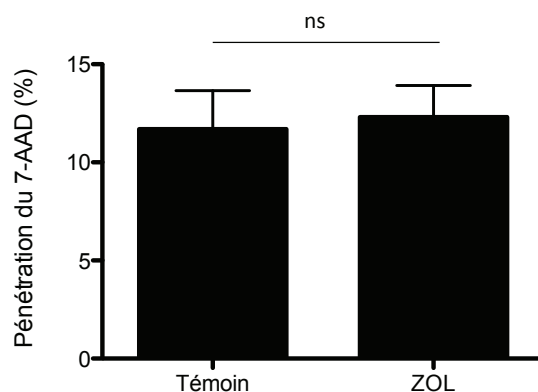


Figure 43 : Viabilité de cellules 4T1 traitées au ZOL

Les cellules 4T1 ont été mises en présence de ZOL (25 μ M) ou de PBS (témoin). La viabilité cellulaire a été étudiée par cytométrie de flux en présence de 7-AAD. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée avec un test à un facteur ANOVA suivi d'une correction de Tukey avec un niveau de significativité fixé à 0,05.

3. Traitements combinés

En accord avec les résultats précédemment obtenus, la Dox à une concentration de 100 nM ainsi que le ZOL à une concentration de 25 μ M n'affectent pas la viabilité cellulaire en comparaison avec le groupe témoin. De même, un traitement C-US n'affecte pas la viabilité cellulaire en comparaison avec le groupe témoin ($p > 0.05$). Un traitement C-US associé au ZOL (ZOL + C-US) n'induit pas non plus une augmentation de la pénétration du 7-AAD par rapport au groupe témoin. Un traitement combiné à la Dox et au ZOL (Dox + ZOL) augmente la pénétration du 7-AAD de 40% par rapport au groupe Dox ($p < 0.01$).

Le traitement C-US combiné avec de la doxorubicine (Dox + C-US) augmente la pénétration du 7-AAD de 82% par rapport au groupe Dox seule ($p < 0.001$). Une augmentation significative de 22% a été mise en évidence entre le groupe Dox + C-US et Dox + ZOL + C-US ($p < 0.01$) soulignant l'intérêt d'ajouter du ZOL pour renforcer l'effet induit. L'association de LIPUS à la Dox (Dox + LIPUS) entraîne une augmentation significative de la pénétration du 7-AAD par rapport à la Dox seule (respectivement 53% vs 13% ; $p < 0.001$). Le traitement de cellules 4T1 avec du ZOL et des LIPUS n'affecte pas la viabilité cellulaire en comparaison avec le groupe ZOL ($p > 0.05$). Un traitement associant Dox + ZOL + LIPUS induit une augmentation de la pénétration du 7-AAD par rapport au groupe Dox + ZOL (respectivement 76% vs 20% ; $p < 0.001$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes Dox + ZOL + C-US et Dox + ZOL + LIPUS même si les valeurs obtenues pour le groupe C-US semblent supérieures. Pour chaque condition, 8 échantillons différents ont été traités puis analysés (**Figure 44**).

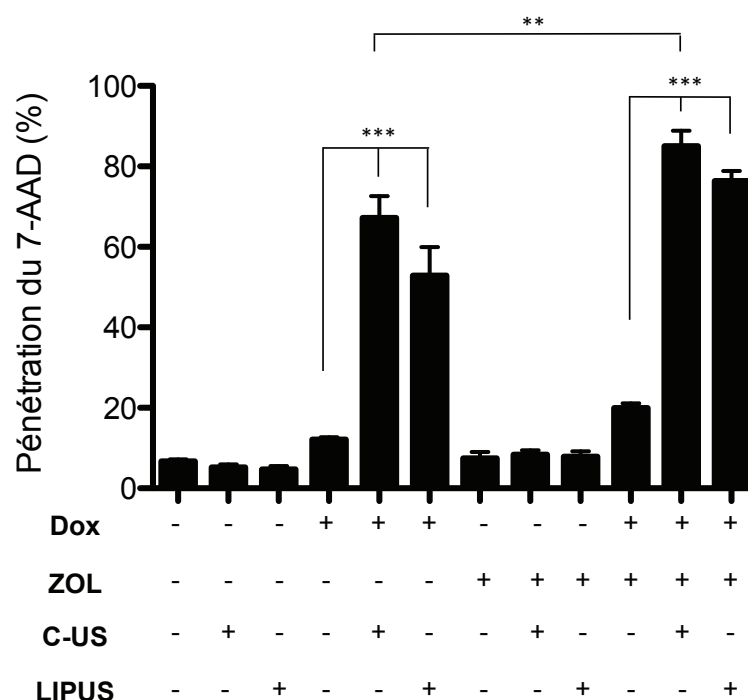


Figure 44 : Effets des US, de la Dox et du ZOL sur la viabilité cellulaire des 4T1

Les cellules 4T1 ont été traitées soit avec de la Dox (100 nm) et/ ou du ZOL (25 μ m). Un traitement ultrasonore C-US ou LIPUS unique de 30 minutes a été réalisé après ajout de la drogue. Les cellules ont ensuite été placées à l'incubateur jusqu'au lendemain. Elles ont été incubées avec du 7-AAD pour une analyse en cytométrie de flux. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée avec un test à un facteur ANOVA suivi d'une correction de Tukey. La puissance du test a été fixée à 95% tandis que $\alpha = 0.05$. **: $p < 0.01$. ***: $p < 0.001$.

Cette étude démontre que l'association Dox + ZOL affecte davantage la viabilité des cellules 4T1 en comparaison avec la Dox seule, soulignant un effet synergique entre les deux drogues. La capacité des C-US et des LIPUS à favoriser le passage du ZOL et d'une autre drogue, la Dox, a également été démontrée.

B. Etude in vivo

1. Tolérance des traitements

L'anesthésie réalisée à J0 entraîne, pour tous les groupes, une diminution du poids entre J0 et J1. Cette baisse attendue est attribuée à l'anesthésie et au geste chirurgical qui consiste à injecter des cellules dans la glande mammaire. Le poids des animaux se stabilise à J2 pour amorcer une augmentation à J3 (**Figure 45**). Le poids des animaux est stable entre J3 et J7 puis diminue fortement entre J7 et J9. Cette baisse peut être attribuée à l'étape d'épilation, qui nécessite une anesthésie des animaux prolongée puis les souris ne recevant aucun traitement (ultrasonore et /ou chimique) présentent également une perte de poids importante. Le poids des animaux se stabilise ensuite jusqu'à J15, sans différence significative (**Figure 45**).

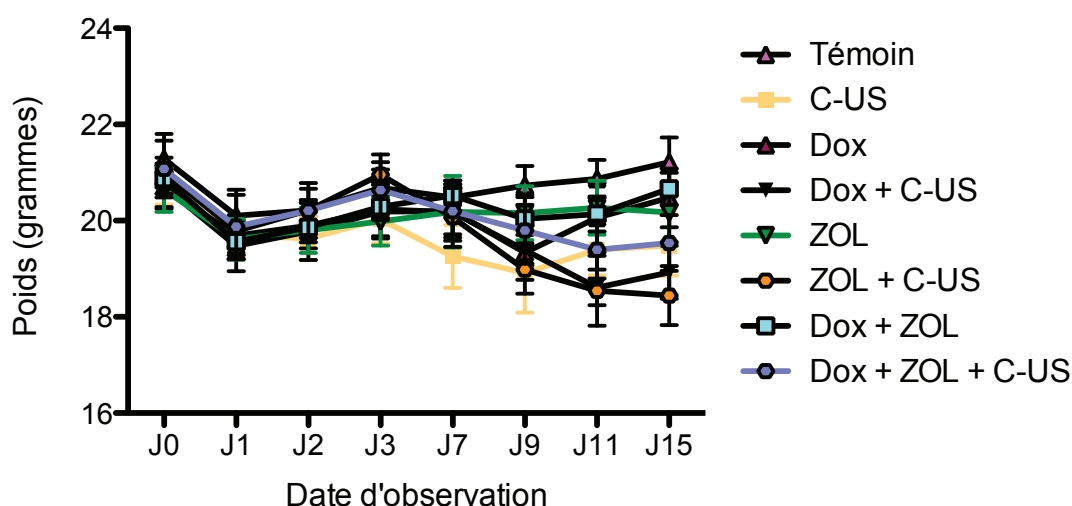


Figure 45 : Evolution du poids des animaux pour les différents groupes de traitement.

Les animaux ont été pesés J0, le jour de l'injection des cellules tumorales. Ils ont ensuite été pesés tous les jours jusqu'à J3. Le premier jour des traitements, à J7, les souris ont été pesées puis tous les deux jours jusqu'à J11. Enfin, elles ont été pesées à J15, jour de la résection de la tumeur mammaire. Les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM.

2. Evolution du volume tumoral

A J7, l'ensemble des groupes présente un volume tumoral compris entre 41 et 50 mm³, sans différence significative entre tous les groupes. Le volume tumoral des groupes témoin et C-US, augmente régulièrement jusqu'à J15 pour atteindre 551 \pm 99 mm³ pour le groupe témoin et 344 \pm 110 mm³ pour le groupe C-US ($p > 0.05$). Le volume tumoral mesuré chez des souris ayant reçu une dose de Dox à J7 est significativement plus faible à J15 (228 \pm 46 mm³), en comparaison avec le groupe témoin ($p < 0.01$). De la même façon, une dose de Dox combinée avec du ZOL permet de réduire significativement le volume tumoral à J15 (200 \pm 53 mm³, $p < 0.01$ en comparaison avec le groupe témoin). Une dose de ZOL n'affecte pas le volume tumoral (258 \pm 46 mm³) par rapport au groupe témoin ($p > 0.05$). Le volume tumoral mesuré à J9 (57 \pm 12 mm³) chez des souris ayant reçu une dose de Dox immédiatement suivie d'un traitement C-US, diminue significativement par rapport au groupe témoin ($p < 0.05$). Cependant il n'y a pas de différence significative par rapport au groupe Dox. Après J7 le volume tumoral augmente régulièrement pour finalement atteindre 162 \pm 38 mm³ à J15. Une dose de ZOL associée à un traitement C-US réduit le volume tumoral à J15 (258 \pm 46 mm³) par rapport au groupe témoin ($p < 0.01$) mais sans différence significative par rapport au groupe ZOL. Enfin, l'injection de Dox associée à une dose de ZOL et à un traitement C-US entraîne une diminution significative du volume tumoral à J15 (109 \pm 32 mm³) par rapport au groupe témoin ($p < 0.01$), Dox ($p < 0.01$) et Dox + ZOL ($p < 0.01$). Toutefois, l'évolution du volume tumoral est relativement faible entre J7 et J11 et semble

plus marquée entre J11 et J15 suggérant de nouveau une perte d'efficacité du traitement C-US au cours du temps. Une dose de Dox, associée à une dose de ZOL et à un traitement C-US (Dox + ZOL + C-US) réduit significativement ($p < 0.01$) le volume tumoral entre J7 et J15 démontrant l'apport des ultrasons. Cependant, cet effet semble faiblir au cours du temps avec une reprise de l'évolution du volume tumoral entre J11 et J15 (**Figure 46**) (**Tableau 5**).

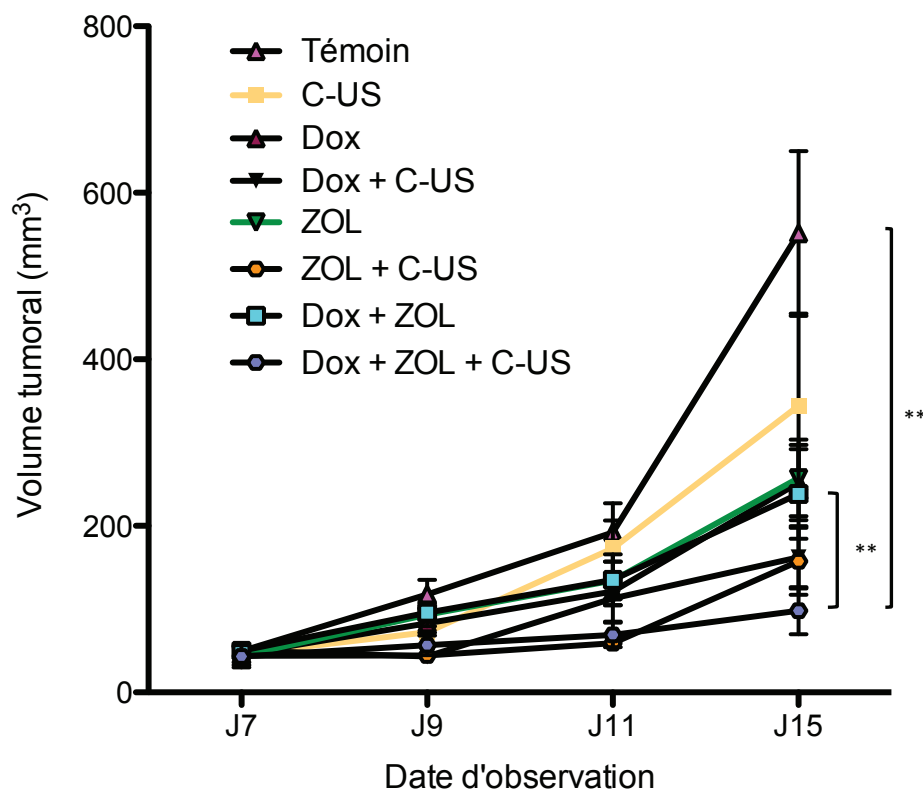


Figure 46 : Mesure des volumes tumoraux entre J7 et J15

(A) Evolution du volume tumoral entre J7 et J15. Le volume tumoral a été mesuré au pied à coulisse. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne (en mm^3) \pm SEM. La valeur de p indiquée correspond à la comparaison entre le groupe Dox + ZOL et Dox + ZOL + C-US à J15. **: $p < 0.01$.

Groupes	n	J7	J9	J11	J15
Témoin	7	49 ± 7	118 ± 17	192 ± 35	551 ± 99
C-US	7	46 ± 7	72 ± 7	173 ± 33	344 ± 111
Dox	8	46 ± 10	83 ± 11	121 ± 17	229 ± 46
Dox + C-US	8	50 ± 8	43 ± 7	79 ± 10	162 ± 37
ZOL	8	44 ± 11	94 ± 14	135 ± 22	258 ± 46
ZOL+C-US	8	44 ± 7	45 ± 8	59 ± 6	157 ± 40
Dox + ZOL	7	41 ± 8	85 ± 13	121 ± 30	199 ± 54
Dox + ZOL + C-US	8	43 ± 5	57 ± 12	69 ± 15	109 ± 32

Tableau 5 : Evolution des volumes tumoraux entre J7 et J15

Les volumes tumoraux ont été mesurés à J7, J9, J11 et J15. n correspond au nombre d'animaux inclus dans l'étude. C-US : traitements ultrasonores continus quotidiens entre J7 et J14 ; Dox : injection de Dox à J7 ; Dox + C-US : injection de Dox à J7 suivie d'un traitement C-US entre J7 et J14 ; ZOL : injection de ZOL à J8 ; ZOL + C-US : injection de ZOL à J8 et C-US entre J7 et J14 ; Dox + ZOL : injection de Dox à J7 et injection de ZOL à J8 ; Dox + ZOL + C-US : injection de Dox à J7 puis de ZOL à J8 et C-US entre J7 et J14. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism. Une comparaison entre les groupes a été effectuée avec des tests bilatéraux de Wilcoxon. $\alpha = 0.05$.

3. Poids des tumeurs primaires

Les tumeurs primaires mammaires ont été récupérées à J15 et pesées. Les résultats montrent que les poids mesurés pour des tumeurs appartenant au groupe témoin sont comme attendu les plus élevés (542 ± 117 mg). Aucune différence significative n'est observée par rapport au groupe C-US. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes Dox, Dox + C-US, ZOL et ZOL + C-US. Un poids plus faible est observé dans le groupe Dox + ZOL + C-US. Ce résultat est significatif par rapport au groupe témoin ($p < 0.05$) et au groupe Dox + ZOL ($p < 0.05$) (**Figure 47**).

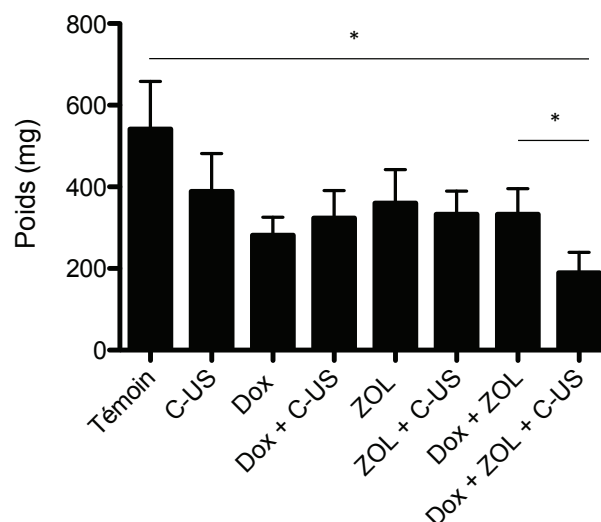


Figure 47 : Poids de la tumeur primaire mammaire 4T1

A la fin des traitements ultrasonores et/ou chimiques, les tumeurs ont été récupérées à J15 et pesées. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM et analysés avec le logiciel GraphPad Prism, en utilisant un test bilatéral de Wilcoxon avec $\alpha = 0.05$. * : $p < 0.05$.

4. Immunohistochimie

L'analyse immuno-histochimique a été réalisée sur les tumeurs primaires prélevées à J15.

Dans un premier temps, l'analyse de la prolifération tumorale a été évaluée par un marquage Ki-67 (**Figure 48-A**). L'index Ki-67 mesuré dans tous les groupes est compris entre 35 et 50. Aucune différence significative n'a été mise en évidence. Dans un second temps, la mesure du marquage CD31, mettant en évidence les vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs mammaires n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre les différents groupes de traitement (**Figure 48-B**).

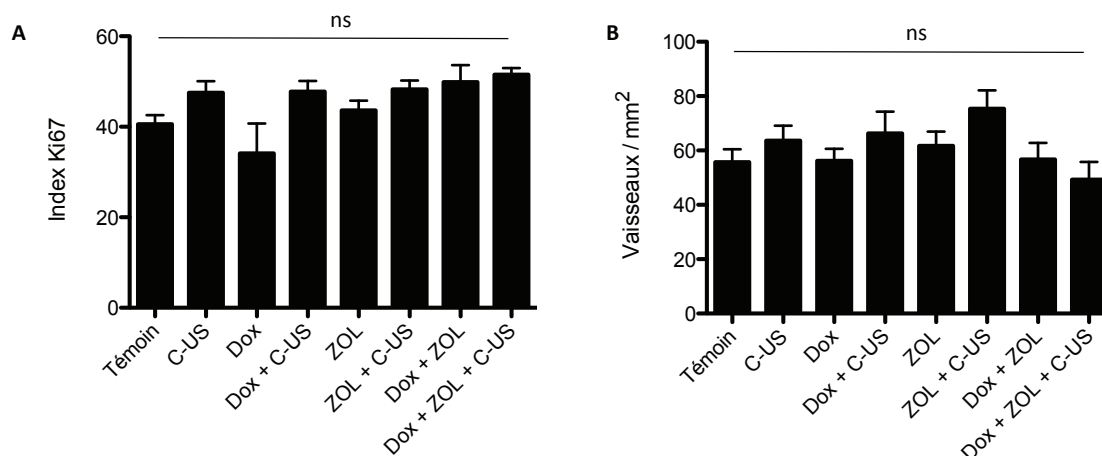


Figure 48 : Immunohistochimie réalisée sur la tumeur primaire mammaire 4T1

(A) Analyse de la prolifération tumorale. L'index Ki-67 correspond à un ratio entre le nombre de cellules en état de prolifération et le nombre total de cellules. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (B) Analyse de l'angiogenèse tumorale réalisée avec un marquage épithélial CD31. Les vaisseaux sanguins sont comptabilisés et rapportés à la surface tumorale (en mm²). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM.

IV) CONCLUSION

L'association d'une chimiothérapie à un BP et des C-US permet, *in vitro*, d'affecter la viabilité des cellules tumorales 4T1. Conformément aux résultats obtenus dans les précédents chapitres, les US seuls n'affectent pas la viabilité des cellules. Volontairement, la dose de Dox a été choisie pour induire un pourcentage de mort cellulaire compris entre 10 et 20%. La dose de ZOL, semblable à celle utilisée dans le chapitre 2, n'affecte également pas la viabilité des cellules 4T1. Un traitement C-US ou LIPUS associé à la Dox affecte la viabilité des cellules par rapport à la Dox seule. De plus, un traitement combinant Dox, ZOL, et C-US ou LIPUS affecte d'autant plus la viabilité cellulaire soulignant l'apport des US dans la pénétration des drogues au sein des cellules tumorales. Cette étude confirme l'apport des US pour favoriser la pénétration de drogues (Dox et ZOL) au sein des cellules tumorales. Cependant les mécanismes d'internalisation de ces deux drogues diffèrent : la Dox pénètre par diffusion alors que le ZOL est internalisé dans les cellules par endocytose. Un autre mécanisme relatif à l'utilisation des LIPUS et des C-US est peut être alors impliqué dans les résultats mis en évidence dans ce chapitre.

L'étude réalisée *in vivo* sur des tumeurs mammaires démontre une diminution du volume tumoral et du poids de la tumeur primaire dans le groupe de traitement associant Dox, ZOL et C-US. Cependant, l'effet de ce traitement semble perdre en efficacité au fur et à mesure de l'avancée du protocole. Aucune différence n'a été notée entre les groupes concernant la prolifération et l'angiogenèse tumorale. Enfin, le volume tumoral évalué dans le groupe

associant ZOL et C-US augmente plus faiblement que pour le groupe ZOL seul suggérant que ce traitement est également efficace sur un modèle tumoral différent de celui utilisé dans le chapitre précédent (MDA-MB-231/B02). Comme vu précédemment, le traitement perd de son efficacité au cours du temps avec une augmentation du volume tumoral largement plus prononcée entre J11 et J15.

Cette étude préliminaire doit cependant être confirmée. Plusieurs hypothèses pourront être testées : ainsi, l'arrêt du protocole à J9 pourrait être effectuée afin de vérifier que le traitement C-US est efficace pendant les premiers jours du protocole. Le volume tumoral mesuré dans le groupe associant Dox et C-US démontre en effet une stabilisation du volume tumoral 2 jours après le début du traitement, suggérant un effet immédiat mais limité dans le temps. Les analyses immuno-histochimiques pourront être renouvelées à ce moment. Une autre possibilité consisterait à tenir compte de la rapidité avec laquelle la Dox gagne les tissus après son injection. Il pourrait ainsi être intéressant de fractionner la dose unique de Dox en doses métronomiques afin d'appliquer les C-US juste après l'injection de la Dox.

Les cellules 4T1 présentent également la capacité de disséminer spontanément aux poumons surtout, et dans une moindre mesure, aux os. Le renouvellement de ce protocole pourrait ainsi permettre d'évaluer l'effet des C-US sur la dissémination métastatique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse a consisté à potentialiser l'effet antitumoral des bisphosphonates (BPs) en utilisant des ultrasons (US) de faible intensité. La démonstration d'une telle possibilité thérapeutique a été faite au moyen d'études *in vitro* puis *in vivo* sur des modèles murins de métastases osseuses et de tumeurs sous-cutanées. Des études *in vitro* et *in vivo* ont également permis de mettre en évidence certains des mécanismes impliqués dans un tel processus. Enfin une ouverture de ce travail a été proposée avec l'utilisation des US de faible intensité pour potentialiser l'action de la doxorubicine (Dox).

I) CONCLUSIONS EXPERIMENTALES

A. Potentialisation de l'effet antitumoral des BPs par C-US

Les expériences réalisées sur un modèle murin de métastases osseuses ont démontré que l'association d'une dose clinique de zolédronate (ZOL) combiné à un traitement par ultrasons continus de faible intensité (C-US) produisait un effet antitumoral direct. L'accumulation de la forme non prénylée de Rap1A, détectée dans les moelles osseuses d'animaux ayant reçu ce traitement démontre la pénétration du ZOL au sein des cellules constituant la moelle osseuse (cellules tumorales mais également cellules progénitrices de la moelle osseuse) sous l'effet du traitement C-US. Un traitement uniquement par C-US n'a pas la capacité d'agir sur les lyses osseuses ni sur la masse tumorale. De même, un traitement uniquement par ZOL n'a aucun effet sur la masse tumorale. L'utilisation d'un BP fluorescent a mis en évidence le relargage du BP de l'os sous l'effet des C-US. Ce relargage permet une imprégnation continue de la moelle osseuse par le ZOL qui pénètre ensuite dans la tumeur sous l'effet des C-US conduisant à l'effet antitumoral observé. Les travaux qui ont suivis reposaient sur l'hypothèse que si le BP pouvait de nouveau circuler dans le sang sous l'effet des C-US, il pouvait se révéler efficace à distance du site osseux et agir en particulier sur la vascularisation des tumeurs mammaires. Dans ce contexte, des études *in vivo* ont démontré que les C-US associés à une dose clinique de ZOL inhibaient la croissance des tumeurs sous-cutanées. Une accumulation de la forme non prénylée de Rap1A a été retrouvée dans les extraits tumoraux démontrant une pénétration du ZOL dans les tumeurs traitées par ZOL et C-US et situées à distance de l'os.

Compte tenu du potentiel des LIPUS dans le domaine osseux pour la consolidation des fractures, des expériences ont également été réalisées *in vivo* sur des modèles murins

métastatiques et de tumeurs sous-cutanées de manière identique aux traitements C-US. Les résultats n'ont pas été significatifs bien qu'une diminution de l'étendue des lyses osseuses ait été observée (Annexes, pages 132-133). Le relargage du BP fluorescent hors de l'os est également moindre sous l'effet des traitements LIPUS (Annexes, pages 136-137). Ainsi, malgré leurs effets pour accélérer la consolidation de fractures, les LIPUS demeurent moins efficaces que les C-US pour faire pénétrer le ZOL dans les tumeurs. L'hyperthermie associée à la stimulation mécanique générée par les C-US est l'approche la plus probante pour faciliter la pénétration du ZOL que la seule stimulation mécanique induite par un traitement LIPUS. L'augmentation de la perméabilité membranaire, concomitante avec une stimulation des tissus, la baisse de la pression intra-tumorale et l'augmentation du flux sanguin peuvent expliquer ce phénomène induit par les C-US.

Ces études *in vivo* présentent également des limites expérimentales, en particulier la nécessité d'utiliser un modèle murin immunodéficient (sans lymphocytes T) afin de faciliter la prise tumorale, ce qui ne correspond pas à une situation clinique. De plus, le jeune âge des animaux (5 semaines au début de l'expérience) correspond à une période de puberté synonyme d'intense modelage osseux. Ainsi, la formation des lyses osseuses est accélérée tout comme le phénomène de libération du BP hors de l'os. Le choix d'animaux jeunes repose également sur la volonté de faciliter la prise tumorale (272). Ces expériences pourraient être reconduites chez des animaux plus âgés afin de comparer les conclusions et de se placer dans une situation plus proche d'un traitement en clinique.

De plus, les métastases osseuses induites par l'injection des cellules tumorales MDA-MB-231/B02 ne miment pas exactement une situation clinique débutant par la présence d'une tumeur primaire mammaire et métastasante ensuite à des organes secondaires comme l'os. Ce modèle développé au laboratoire (249) a été choisi puisqu'il permettait l'obtention rapide et localisée de métastases osseuses. Cependant, les cellules T47-D ou MCF-7, exprimant fortement les antigènes IPP et ApppI, auraient pu être aussi utilisées. Les cellules MCF-7 et T47-D génèrent aussi des lyses osseuses après leur injection par voie intra-tibiale et intra-cardiaque respectivement. Cependant, elles peuvent former des métastases à d'autres organes, contrairement aux cellules MDA-MB-231/B02. Ceci pourrait avoir un impact sur la survie des animaux et ainsi empêcher la répétition des traitements ultrasonores et l'observation des effets sur les périodes de l'étude. Le modèle cellulaire utilisé dans ces expériences a permis d'obtenir uniquement des métastases osseuses dans un délai court et compatible avec des traitements répétés jusqu'à environ 32 jours après injection des cellules tumorales.

Afin de visualiser la répartition du BP au niveau des os des pattes postérieures, un BP fluorescent a été utilisé (273). Ce dernier n'était pas du ZOL mais du risédronate couplé à une molécule de fluorescéine (FAM-RIS). Ces deux BPs font partie de la famille des N-BPs et possèdent donc un mode d'action similaire mais à des puissances inhibitrices différentes, environ trois fois supérieure pour le ZOL par rapport au risédronate (274). La fixation du FAM-RIS au minéral osseux n'est pas modifiée par rapport au ZOL mais son poids moléculaire (714 Da) est plus important que celui du ZOL (283 Da) ce qui peut influencer les mécanismes impliqués dans les processus de désorption observés avec les US. D'autre part, les animaux de cette étude n'ont pas reçu d'injection de cellules tumorales au préalable et ne présentaient ainsi pas de lyses osseuses ni de tumeur. Ceci a pu avoir un rôle puisqu'il a été montré que le BP se liait préférentiellement à des zones où la densité osseuse est faible (corticales, plaques de croissance) où à des zones à fort remodelage osseux (273).

B. Les C-US en situation néo-adjuvante

L'intérêt pour les BPs dans le traitement du cancer du sein est grandissant depuis plusieurs années. Des essais cliniques de phase III ont montré que le ZOL associé à d'autres thérapies (hormonothérapie, chimiothérapie) augmentait la survie des patientes lorsque celles-ci étaient post-ménopausées (68). L'essai ABCSG-12 a démontré que la survie des patientes ayant reçu du ZOL en plus d'une hormonothérapie était augmentée et que cet effet persistait jusqu'à 84 mois. Cet effet rémanent peut s'expliquer par les propriétés pharmacologiques du ZOL qui lui confèrent une forte affinité pour le minéral osseux. Compte tenu de ces observations et des résultats obtenus dans les parties précédentes, l'hypothèse qu'un traitement C-US pouvait induire la pénétration de BPs dans les tumeurs mammaires et ainsi agir sur cette dernière a été explorée. Un modèle animal murin de tumeur mammaire a été utilisé en reproduisant une situation néo-adjuvante clinique en associant le traitement C-US à une chimiothérapie (la doxorubicine - Dox) et un BP (le ZOL). Les résultats montrent qu'un traitement combinant Dox, ZOL et C-US permet d'inhiber la croissance tumorale par rapport à des animaux ayant reçu seulement la Dox ou un traitement Dox + ZOL. Les données histologiques sur la prolifération tumorale ou l'angiogenèse n'ont pas permis de confirmer l'observation macroscopique. Une diminution du volume tumoral a également été notée pendant les premiers jours du groupe traité en associant ZOL et C-US confirmant ce qui avait déjà été réalisé lors de l'étude portant sur les tumeurs sous-cutanées. Ainsi, sur un modèle cellulaire différent, le bénéfice apporté par les C-US est démontré sur le volume tumoral mais diminue avec le temps suggérant encore une fois une diminution de la quantité

de BPs libérée dans la circulation sanguine. Ces premières expériences nécessitent d'être confirmées. De plus amples investigations sont nécessaires notamment en ce qui concerne la délivrance de la Dox par C-US et l'impact sur la dissémination métastatique aux poumons et à l'os.

Le modèle de tumeurs 4T1 permet une bonne reproduction de la situation clinique ainsi que l'obtention rapide de tumeurs qui peuvent être réséquées et qui sont sensibles à l'action de la Dox. Une des limites du modèle est le manque d'information bibliographique sur l'effet du ZOL sur ces cellules. L'action du ZOL est d'autant plus difficile à évaluer que l'expression des antigènes IPP et ApppI n'est pas connue. Une étude détaillée sur l'accumulation d'IPP et d'ApppI devrait être menée afin de mieux connaître le potentiel du ZOL sur cette lignée cellulaire. Le modèle cellulaire MDA-MB-436 injecté chez des souris femelles MF1 pourrait ainsi permettre le développement de tumeurs mammaires sensibles à la Dox et au ZOL et a déjà été décrit (156), ce qui permettrait également d'évaluer l'efficacité thérapeutique des traitements combinés Dox, ZOL et C-US.

C. Mécanismes d'action des US

Les études *in vitro* présentées dans cette thèse sont relatives à la pénétration d'une drogue non encapsulée dans des cellules tumorales au moyen d'US de faible intensité afin d'éviter d'impliquer des phénomènes de cavitation qui peuvent être difficiles à produire et à contrôler *in vivo* et donc en situation clinique.

Les paramètres acoustiques pour les C-US ont été définis de façon à induire une augmentation de la température de 6°C environ chez les animaux. La température visée était située entre 42°C et 43°C au niveau des pattes postérieures. Ces paramètres ont été appliqués pendant 30 minutes et permettent une augmentation lente de la température pendant les 6 premières minutes du traitement jusqu'à la valeur souhaitée puis un maintien de cette température pendant les 24 minutes restantes. Lors des essais *in vitro* sur des cultures cellulaires, les paramètres ultrasonores ont été ajustés pour que la température initiale des milieux de culture à 37°C soit portée à 43°C à la fin des 30 minutes de traitement aux C-US. De plus, la répartition de la chaleur générée dans les boîtes de Pétri n'est pas comparable à ce qui est observé dans des tissus vivants perfusés (254). De manière à différencier l'effet de la température de l'effet mécanique induit par les C-US, les cellules ont été traitées avec une hyperthermie seule. Dans ces expériences, il a été démontré que l'effet de la température ne permet pas une pénétration du ZOL aussi importante que par un traitement C-US. De plus, cette pénétration observée lors d'un traitement C-US n'est pas

une addition d'un effet thermique et d'un effet mécanique mais bien une synergie entre l'augmentation de la perméabilité membranaire induite par l'hyperthermie et la pénétration des drogues sous l'effet d'un stress mécanique produit par les US. Ainsi, l'association d'une augmentation de la température et d'une stimulation mécanique a été plus efficace qu'une stimulation mécanique seule (LIPUS) ou qu'une hyperthermie seule pour faciliter la pénétration de ZOL dans des cellules tumorales. Cependant, la stimulation mécanique induite par les LIPUS n'est pas comparable à celle produite par C-US. Ces résultats ont été confirmés sur une autre lignée cellulaire (4T1) avec la DOX démontrant que les traitements C-US associant hyperthermie et stress mécanique sont plus efficaces que les LIPUS ou l'hyperthermie seule pour favoriser la pénétration de drogues dans les cellules, par des voies probablement différentes. Dans le cas de la pénétration du ZOL, une augmentation du phénomène d'endocytose sous l'effet des C-US, et dans une moindre mesure, des LIPUS a été mise en évidence. L'accumulation de clathrines a été particulièrement augmentée sous l'effet des US alors qu'elle n'est pas modifiée par une hyperthermie seule. Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pourquoi les C-US et les LIPUS affectent les taux de clathrines et pas d'autres voies de l'endocytose comme celle médiée par les cavéolines.

Ces résultats ont été complétés par une analyse portant sur l'influence de chaque paramètre constituant la séquence des C-US. Il a ainsi été montré qu'une élévation de la puissance acoustique n'induisait pas forcément une meilleure pénétration du ZOL. En revanche l'élévation de température induite pourrait être délétère *in vivo*, même si elle n'a pas eu de conséquence sur la viabilité cellulaire ou la prolifération cellulaire *in vitro*.

Ces expériences *in vitro* présentent une limite qui consiste en l'utilisation de l'IPP et de l'ApppI qui sont des marqueurs indirects de la pénétration du ZOL. Une mesure directe de la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales aurait pu être réalisé avec un BP fluorescent ou l'utilisation de BP radio-marqué (150). De même, il serait intéressant de vérifier que l'augmentation de la pénétration du ZOL conduit bien, à terme, à une augmentation de la mort cellulaire même s'il a été montré que les taux d'IPP et d'ApppI sont corrélés avec l'effet cytotoxique du ZOL (275). Ceci pourra être fait en laissant les cellules incuber sur des temps plus longs (72 heures) (276). Enfin, l'effet des C-US ou des LIPUS n'a pas été évalué sur la migration, l'invasion et l'adhésion des cellules tumorales. L'ensemble de ces limites sont liées à l'utilisation de sondes ultrasonores possédant un transducteur de 4 cm de diamètre et calibré pour l'insonification des souris. Une telle dimension a nécessité de travailler sur des boîtes de Pétri de 10 cm et ne nous a pas permis de mener à bien ces expériences. Le

développement de transducteurs plus petits est en cours pour permettre d'élargir l'étude des phénomènes induits avec la réalisation de ces expériences.

II) PERSPECTIVES EXPERIMENTALES

A. Etudes des effets mécaniques induits

Plusieurs études ont démontré qu'une stimulation mécanique comme les ondes de cisaillement pouvait déclencher des phénomènes d'endocytose chez des cellules endothéliales (277). Les oscillations induites par les US peuvent engendrer un déplacement entre les éléments constituant le milieu de culture mais également les composants intracellulaires. Ainsi, les US peuvent affecter la concentration intracellulaire de calcium et conduire à la formation de pores membranaires (256). Ceci n'a pas été vérifié dans les expériences présentées car le ZOL est une molécule de faible poids moléculaire mais chargée négativement ce qui complique son passage par la membrane plasmique. Cependant, il pourrait être intéressant de vérifier ce phénomène par microscopie électronique à balayage.

Les US de faible intensité utilisés dans le cadre des études décrites ont pu produire différents stress mécaniques au sein des cultures cellulaires mais également dans les conditions *in vivo* sur l'os. Ce stress peut-être dû aux ondes de Lamb, qui se propagent le long de la surface des boîtes de Pétri sur lesquelles sont fixées les cellules ou le long des os, de la pression de radiation, d'ondes stationnaires et des micro-courants. Ces phénomènes peuvent être à l'origine des résultats *in vitro* obtenus lorsque les US sont appliqués en association avec le ZOL. Une quantification de ces phénomènes serait un réel ajout pour l'ensemble des manipulations *in vitro* et une meilleure utilisation des US.

B. Nanotechnologies

La persistance des cellules tumorales au sein de la moelle osseuse, malgré les traitements, a poussé plusieurs équipes de recherche à développer des solutions alternatives en utilisant notamment des nanoparticules pour délivrer des chimiothérapies directement au niveau de l'os. Récemment, des travaux portant sur l'encapsulation de l'alendronate dans des nanoparticules spécifiques de l'os ont été publiés. L'étude, réalisée dans le cadre du myélome multiple, a démontré que les animaux traités avec ces particules et du bortezomib présentaient un ralentissement de la progression de la maladie (245). La délivrance de BPs directement aux cellules tumorales a également fait l'objet de recherches *in vitro* et il a ainsi été montré que des liposomes encapsulant du clodronate pouvaient inhiber la croissance

tumorale de cellules histiocytaires (278) mais également de cellules MDA-MB-231 dont la croissance est inhibée par des liposomes encapsulant du nérédronate. Cette combinaison s'est révélée 50 fois plus efficace que la drogue seule (279). Le ZOL, encapsulé dans des liposomes pégylés, circule plus longtemps dans le sang. Ainsi 10% de la dose demeure encore détectable 24 heures après injection alors qu'elle est de seulement 0.2% 1 heure après injection sous forme libre (280). Dans le cadre du traitement des métastases osseuses, et afin de mieux cibler les cellules tumorales situées dans la moelle, des nano-vecteurs ont été développés spécifiquement pour cibler l'hydroxyapatite, composant principal de la phase minérale inorganique. Les résultats obtenus ont démontré une augmentation de la cytotoxicité sur des cellules d'ostéosarcome humain (281). Une autre approche a également été testée : il s'agissait cette fois-ci de combiner des liposomes contenant de la Dox à du clodronate, toujours dans le traitement de l'ostéosarcome (282). *In vivo*, cette association a permis l'inhibition de la croissance tumorale associée à une augmentation de la survie.

L'ensemble de ces travaux démontre la volonté de vouloir tenir compte de l'environnement osseux et de la faible délivrance de BPs tels qu'ils sont utilisés actuellement. L'encapsulation de molécules thérapeutiques dans des liposomes et leur relargage dans l'organe ciblé par US sont déjà bien documentés et impliquent très fréquemment un phénomène de cavitation. Les expériences réalisées au cours de cette thèse suggèrent une autre approche en s'affranchissant de ces techniques d'encapsulation et en faisant appel à des US de faible intensité, capables, par leur action thermique et mécanique d'augmenter la délivrance de drogues, sans induire de cavitation. Il serait ainsi intéressant de pouvoir tester ces US de faible intensité en combinaison avec des liposomes encapsulant de la Dox afin d'évaluer l'efficacité de cette association pour le traitement de tumeurs mammaires.

C. Effets des US sur l'environnement osseux

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse se sont concentrés sur la pénétration du ZOL dans les cellules tumorales *in vitro* et sur l'effet antitumoral observé chez des animaux traités avec du ZOL et des C-US. Cette association conduit à une accumulation du ZOL dans les cellules de la moelle osseuse. Cependant, ces études n'ont pas porté sur les cellules constituant l'environnement osseux et la matrice extracellulaire. L'effet des C-US sur les ostéoclastes et sur les ostéoblastes n'a pas été évalué. Ces deux types cellulaires font pourtant partie intégrante du phénomène de cercle vicieux mis en jeu dans le contexte de métastases osseuses. L'effet des LIPUS sur les cellules MC3T3-E1, modèle murin de pré-ostéoblaste et sur des chondrocytes ou des cellules stromales de la moelle osseuse (196) est

bien documenté, cependant rien n'a été fait sur ces modèles avec des C-US en association avec du ZOL. Des analyses moléculaires pourraient être ainsi réalisées afin d'observer l'effet de ces US sur la différenciation et l'activation des ostéoclastes et des ostéoblastes. Ces résultats permettraient une meilleure compréhension de l'effet des US non seulement sur les cellules tumorales mais également sur le milieu dans lequel elles s'établissent.

De plus, des travaux font état du rôle des BPs sur les cellules du système immunitaire, et plus particulièrement sur les macrophages (144, 283). Une étude a démontré que le ZOL pouvait se lier à des micro-calcifications présentes au sein de tumeurs mammaires 4T1. Ces micro-calcifications sont englouties par les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (284). L'effet des US sur les macrophages n'a pas été évalué et pourrait représenter un réel ajout pour mieux prendre en compte les interactions entre la tumeur et le système immunitaire.

D. Paramètres des LIPUS

Les résultats obtenus concernant l'utilisation des LIPUS sont présentés en annexes compte tenu du manque de significativité des résultats. Ces données ont été générées simultanément à celles des C-US et peuvent donc être comparées entre elles. Les LIPUS qui sont utilisés en clinique pour accélérer la consolidation osseuse après une fracture, ont démontré une certaine efficacité dans la délivrance de drogues (DOX et ZOL). Cet effet peut être corrélé à la pénétration des drogues induites par les LIPUS en milieu de culture. Les LIPUS agissent également sur l'endocytose mais de manière moins importante que les C-US. *In vivo* les résultats sont également moins satisfaisants pour les LIPUS que pour les C-US. Ils ne permettent ainsi pas de diminuer de manière significative les lyses osseuses et la masse tumorale mais agissent néanmoins sur l'activité des ostéoclastes (Annexes, pages 137-138). Un effet sur la libération du BP fluorescent semble se dégager mais de manière moins probante que pour les C-US (Annexes, page 141). Enfin, sur le modèle de tumeurs sous-cutanées mammaires, l'effet de l'association ZOL + LIPUS sur la croissance tumorale est moindre en comparaison avec les C-US même si un effet sur la prolifération subsiste à J15 (Annexes, pages 138-139). Ces résultats demandent à être complétés par davantage de manipulations notamment par la réalisation de Western Blots pour évaluer l'accumulation de la forme non prénylée de Rap1A dans les extraits de moelle osseuse et dans les tumeurs sous-cutanées. La variation des paramètres (temps des pulsations, durée d'application) demeure également un point à approfondir pour obtenir, peut-être, un effet significatif. Ces paramètres pourront ensuite être testés *in vivo* afin d'évaluer leur efficacité.

E. Applications à d'autres cancers

Les traitements C-US et, dans une moindre mesure, les LIPUS augmentent la pénétration de drogues *in vitro* suite à une augmentation de l'endocytose médiée par les clathrines. Les résultats obtenus avec le ZOL et la DOX permettent d'envisager des champs thérapeutiques plus larges notamment lorsque la délivrance de chimiothérapie à l'organe cible demeure faible. Le cas du cancer du pancréas apparaît ainsi comme un possible champ d'investigations puisqu'il est l'un des cancers les plus agressifs avec un taux de survie inférieur à 5% au bout de 5 ans. L'un des problèmes majeurs rencontrés dans le cas présent reste la distribution aspécifique des chimiothérapies qui induit des effets secondaires systémiques et une efficacité moindre. L'utilisation d'US de faible intensité apparaît alors comme une thérapie intéressante. Cependant, dans le cas présent, il faudra également évaluer l'effet des US et leurs effets sur le microenvironnement tumoral puisque de fortes réactions stromales ont été mises en évidence (285).

III) PERSPECTIVES CLINIQUES

Suite aux études réalisées au cours de ma thèse, deux perspectives cliniques peuvent être envisagées. La première consisterait à un traitement des métastases osseuses en utilisant des C-US de faible intensité en association avec du ZOL puisque cette association s'est révélée efficace pour diminuer la masse tumorale et les lésions ostéolytiques associées. Cependant, une telle application soulève plusieurs limites à dépasser. Il s'agit en particulier de modifier les paramètres définis dans cette thèse ainsi que les caractéristiques des transducteurs ultrasonores afin de générer une hyperthermie modérée en profondeur chez un être humain sans endommager les tissus avoisinants. Les nouveaux paramètres devront être testés chez un animal dont la répartition des muscles et des graisses est plus similaire à celle de l'homme.

D'autre part, dans les expérimentations réalisées au cours de ma thèse, les animaux présentaient de nombreuses lyses osseuses au niveau des pattes postérieures. La largeur du transducteur (4 cm) a permis d'insonifier les deux pattes postérieures en même temps. En clinique, le nombre de métastases et leur localisation peut être une limite au recrutement des patientes. L'application d'un traitement C-US pourrait être restreinte à une métastase localisée ou à un petit nombre de métastases pouvant être traitées de manière simultanée avec plusieurs transducteurs.

L'efficacité du ZOL en supplément d'une chimiothérapie ou d'une hormothérapie dans le traitement du cancer du sein permet d'envisager une autre approche clinique. Il a, en effet,

été démontré que le ZOL pouvait agir de manière synergique avec une chimiothérapie dans le traitement d'une tumeur primaire mammaire et limiter la dissémination métastatique à l'os chez des patientes ménopausées. Les expériences *in vivo* présentées dans cette thèse démontrent que les C-US facilitent la pénétration du ZOL dans les cellules de la moelle osseuse et peuvent agir à distance également du site osseux, sur une tumeur mammaire. L'étude préliminaire réalisée avec de la DOX démontre que les C-US favorisent également sa pénétration dans des cellules tumorales. Compte tenu de ces résultats, une association entre une chimiothérapie, du ZOL et des C-US pourrait être envisagée. L'évaluation de l'efficacité de ce traitement serait facilitée par la résection de la tumeur primaire mammaire suivie d'une évaluation histologique.

Ainsi, les résultats obtenus au cours de cette thèse initialement dans le domaine des métastases osseuses pourraient être appliqués plus directement, en clinique, pour le traitement d'une tumeur primaire mammaire.

ANNEXES

Les études décrites dans le chapitre 2 montrent que les LIPUS induisent une augmentation de la pénétration du BP dans les cellules tumorales MCF-7 en augmentant l'endocytose médiée par les clathrines. Ainsi, les effets des LIPUS, seuls ou associés à une dose clinique de ZOL, ont été évalués dans chacun des protocoles *in vivo* cités dans les chapitres précédents et sont présentés ci-après. Ces résultats ont été obtenus simultanément à ceux des C-US.

I) EFFET DES LIPUS SUR UN MODELE DE METASTASES OSSEUSES ET DE TUMEUR SOUS-CUTANEE

Les souris Balb c nude âgées de 5 semaines ont reçu une injection intra-artérielle de cellules tumorales MDA-MB-231/B02, induisant des métastases ostéolytiques au niveau des pattes postérieures. Les animaux ont été traités 18 jours après l'injection des cellules tumorales avec une dose de ZOL (100 µg/kg) en combinaison avec des LIPUS appliqués de manière quotidienne entre J18 et J32. L'effet des LIPUS seuls a également été testé tout comme l'impact d'une dose de ZOL immédiatement suivie d'une seule application des LIPUS. Les groupes ont été formés de façon à ce que les surfaces ostéolytiques à J18 soient équivalentes dans tous les groupes de traitement (**Figure 49**). La mesure des lyses osseuses a permis de mettre en évidence que les LIPUS seuls n'ont pas d'effet sur les surfaces ostéolytiques par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, un traitement unique aux LIPUS réalisé juste après l'injection de ZOL (ZOL + LIPUS Uni) n'a pas d'effet sur les lésions ostéolytiques par rapport au groupe ZOL seul ($p=0.65$). Enfin, malgré une baisse de 20% des lyses osseuses, observée lors d'un traitement avec une injection de ZOL puis un traitement LIPUS appliqué quotidiennement (ZOL + LIPUS Quo), cette diminution n'est pas statistiquement significative ($p=0.1$) (**Figure 49**).

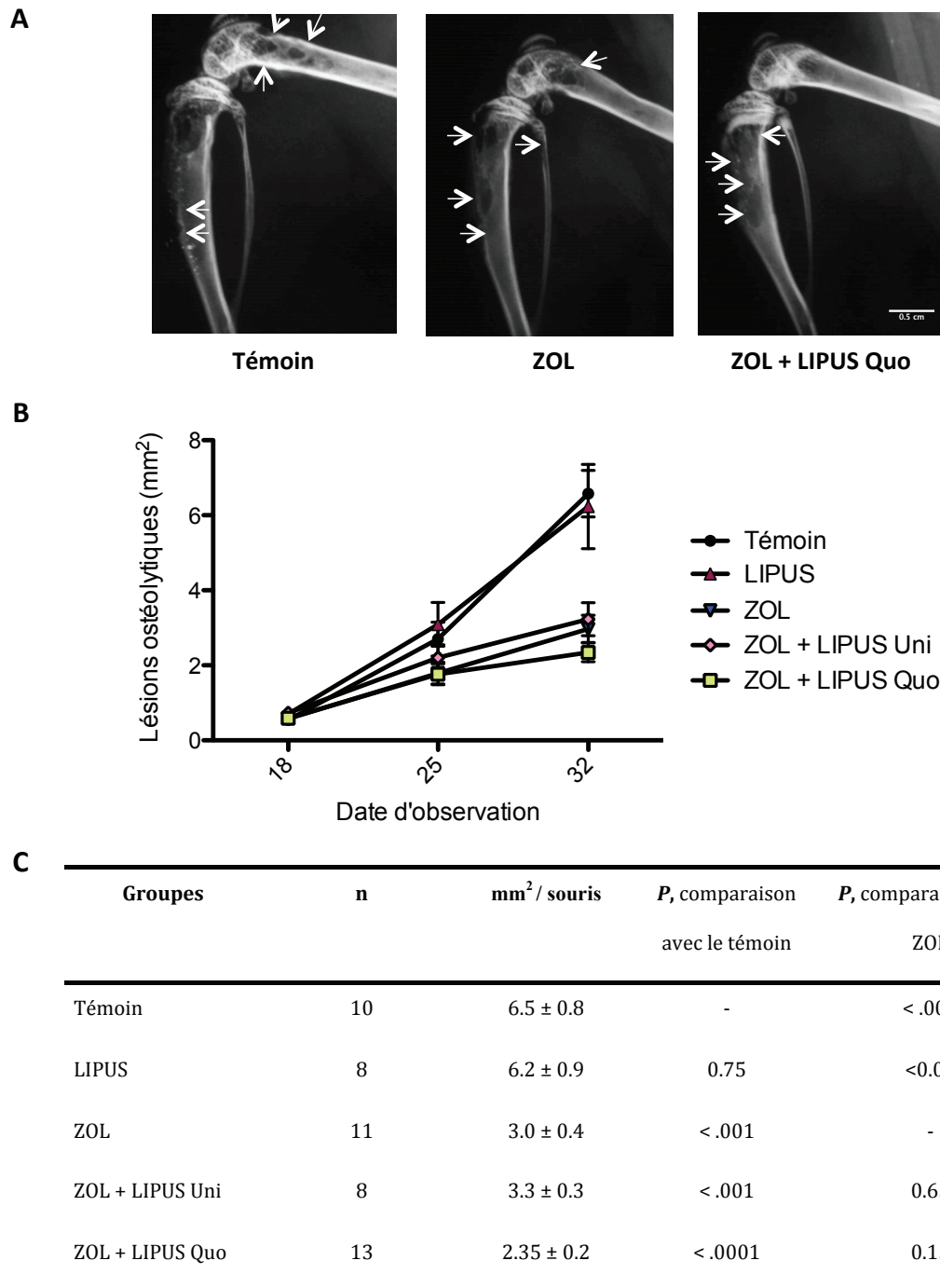


Figure 49 : Evaluation des lyses osseuses avec un traitement LIPUS

(A) Radiographies des pattes postérieures prises à J32, dernier jour du protocole. De gauche à droite : témoin, ZOL (zoledronate seul) et ZOL + LIPUS Quo (ZOL et LIPUS appliqués quotidiennement). Les lésions ostéolytiques sont indiquées par les flèches. (B) : Evolution des lyses osseuses entre le 18^{ème} jour du protocole et le 32^{ème}. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± SEM. LIPUS: ultrasons pulsés quotidiens, ZOL : zoledronate seul, ZOL + LIPUS : ZOL et LIPUS appliqués une seule fois, ZOL + LIPUS Quo : ZOL et LIPUS appliqués quotidiennement. (C) : Tableau décrivant la mesure des lésions ostéolytiques à J32. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne en mm² ± SEM. n représente le nombre de souris incluses dans les résultats. L'analyse statistique a été effectuée en réalisant des tests de Wilcoxon. Les valeurs de p sont données, en comparaison avec le groupe témoin puis avec le groupe ZOL.

Comme précédemment, des mesures *in situ* et sériques ont été réalisées pour évaluer l'activité des ostéoclastes suite aux différents traitements (**Figure 50**). Dans les deux cas, une diminution significative de l'activité des ostéoclastes entre le groupe ZOL et les groupes ZOL + LIPUS Uni ($p<0.05$) et ZOL + LIPUS Quo ($p<0.05$) a été mise en évidence. Ainsi, un ou plusieurs traitements aux LIPUS associés à une dose de ZOL permettent de diminuer l'activité des ostéoclastes.

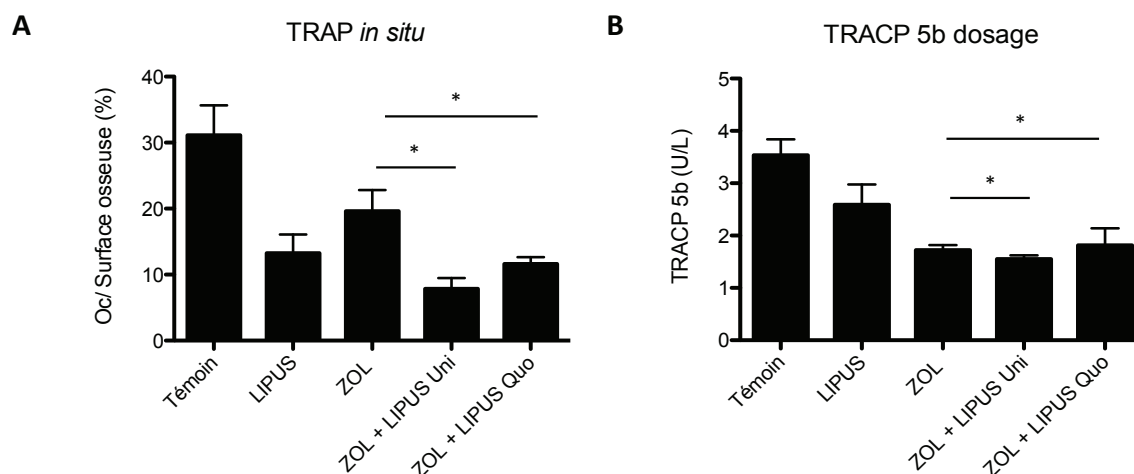
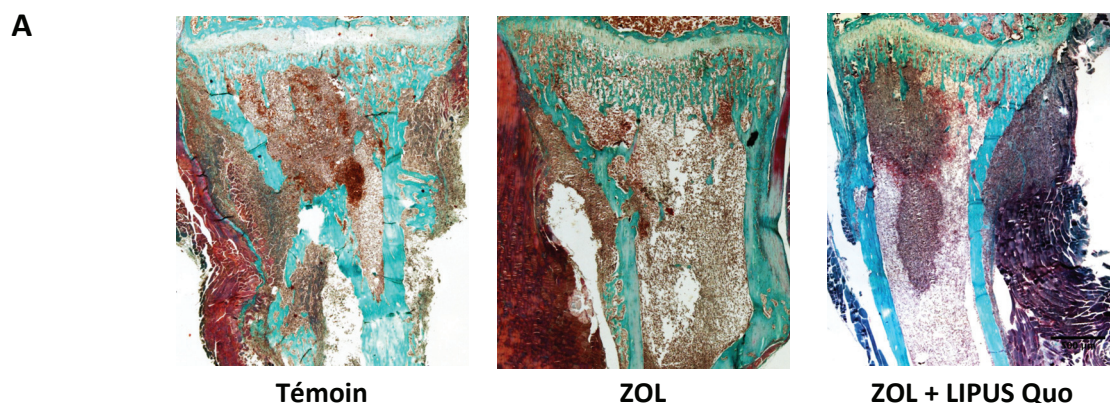


Figure 50 : Activité ostéoclastique suite à un traitement LIPUS

(A) L'activité *in situ* des ostéoclastes est évaluée au moyen d'un marquage de l'activité de TRAP. Le ratio entre les surfaces des ostéoclastes actifs rapportées aux surfaces osseuses en contact avec la tumeur est présenté. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (B) Le dosage sérique de TRAcP 5b est réalisé à partir de sérum de souris métastatiques. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. ZOL : zolédronate seul, LIPUS : ultrasons pulsés seuls, ZOL + LIPUS Quo : zolédronate et ultrasons pulsés quotidiens, ZOL + LIPUS Uni : zolédronate et ultrasons pulsés une seule fois. * : $p<0.05$.

Les masses tumorales ont également été mesurées sur des coupes de tibia colorées au trichrome de Goldner (**Figure 51**). Le traitement LIPUS quotidien n'entraîne pas de différence par rapport au groupe témoin ($p=0.35$). De même, un seul traitement aux LIPUS, lorsque le ZOL est encore circulant dans le sang (ZOL + LIPUS Uni), ne diminue pas la masse tumorale par rapport au groupe ZOL ($p=0.48$). Enfin, si les masses tumorales mesurées dans les tibias de souris traitées avec du ZOL et des LIPUS quotidiens sont significativement plus faibles que celles mesurées dans le groupe témoin ($p<0.01$), elles demeurent similaires à celles observées dans le groupe ZOL ($p=0.36$). Ces résultats suggèrent que les LIPUS n'ont pas eu d'effet sur la tumeur osseuse.



B

Groupe	Nombre de souris	Volume osseux (BV/TV, %)	<i>P</i> , comparaison avec le témoin	<i>P</i> , comparaison avec le groupe ZOL	Masse tumorale (TB/STV, %)	<i>P</i> , comparaison avec le témoin	<i>P</i> , comparaison avec le groupe ZOL
Naïve	4	30 ± 1,4	-	-	0	-	-
Témoin	6	20 ± 1,8	-	-	62 ± 4,6	-	0.05
LIPUS	8	23 ± 2,3	0.01	0.6	52 ± 7,2	0.35	0.57
ZOL	6	28 ± 3,0	0.04	-	46 ± 7,6	0.10	-
ZOL + LIPUS Uni	4	24 ± 2,1	0.46	0.6	55 ± 9,9	0.62	0.48
ZOL + LIPUS Quo	7	30 ± 3,2	0.001	0.14	38 ± 4,4	<0.01	0.36

Figure 51 : Effets des LIPUS sur la masse tumorale

(A) De gauche à droite : Trichrome de Goldner de souris témoin, zolédronate (ZOL) et zolédronate et ultrasons pulsés quotidiens (ZOL + LIPUS Quo). (B) : Mesures du volume osseux (BV) par rapport au volume total (TV) en % et de la masse tumorale (TB) par rapport au volume de tissu mou (STV) également en %. Les valeurs de BV/TV et TB/STV pour une souris dite « naïve » (sans métastases, sans traitement) sont données à titre indicatif. LIPUS : ultrasons pulsés quotidiens, ZOL : zolédronate seul, ZOL + LIPUS Uni : zolédronate et LIPUS appliqués une seule fois, ZOL + LIPUS Quo : ZOL et LIPUS appliqués quotidiennement. Le nombre de souris incluses dans l'analyse statistique est donné. Les valeurs de *p* sont données en comparaison avec le groupe témoin et le groupe zolédronate seul.

L'analyse immuno-histochimique des tumeurs osseuses a été réalisée sur les coupes de pattes d'animaux. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes, que ce soit pour l'analyse de l'angiogenèse (**Figure 52-A**) ou de la prolifération des cellules tumorales (**Figure 52-B**).

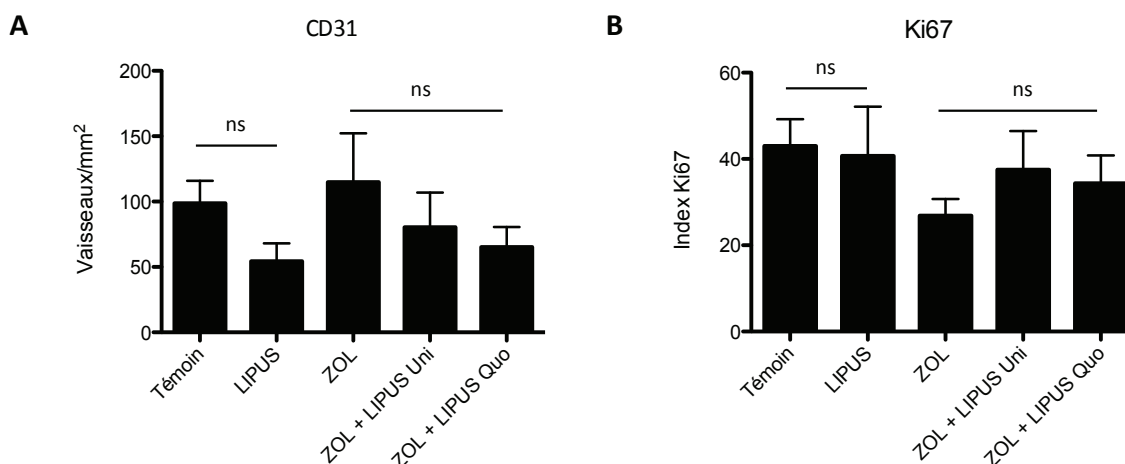


Figure 52 : Angiogenèse et prolifération tumorale

Analyse immuno-histochimique du marquage CD31. Les vaisseaux sanguins sont comptabilisés et rapportés à la surface tumorale. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (B) Analyse immuno-histochimique du marquage Ki-67. L'index Ki-67 est calculé sous forme de pourcentage : les cellules Ki+ sont rapportées au nombre total de cellules. Dans les deux cas, l'analyse statistique est réalisée au moyen de tests de Wilcoxon. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. LIPUS : ultrasons pulsés appliqués quotidiennement, ZOL + LIPUS Uni : zolédronate et ultrasons pulsés appliqués une seule fois, ZOL + LIPUS Quo : zolédronate et ultrasons pulsés appliqués quotidiennement.

De la même manière que précédemment, la quantité de BP encore liée à l'os après un traitement LIPUS répété quotidiennement a été étudiée. Un BP fluorescent (risédronate couplé à une molécule de fluorescéine, FAM-RIS) a été utilisé sur des animaux traités et suivis pendant deux semaines. L'analyse a été effectuée sur des coupes de tibias sous un microscope à épifluorescence. L'intensité de fluorescence et les surfaces encore marquées par le BP fluorescent ont été ensuite évaluées (**Figure 53**). Une diminution des surfaces marquées par le BP fluorescent a été mise en évidence lorsque les animaux ont reçu des traitements LIPUS appliqués quotidiennement. Cette diminution est statistiquement significative par rapport au groupe BP fluorescent seul. En revanche, aucune différence n'a été observée concernant l'intensité de fluorescence mesurée dans les pattes de souris ayant reçu du BP fluorescent et des LIPUS ($p=0.6$)

Ainsi, malgré une diminution de l'activité des ostéoclastes et des surfaces ayant fixé le BP après 13 jours de traitement aux LIPUS, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les lyses osseuses, la masse tumorale et les phénomènes d'angiogenèse et de prolifération tumorale associés.

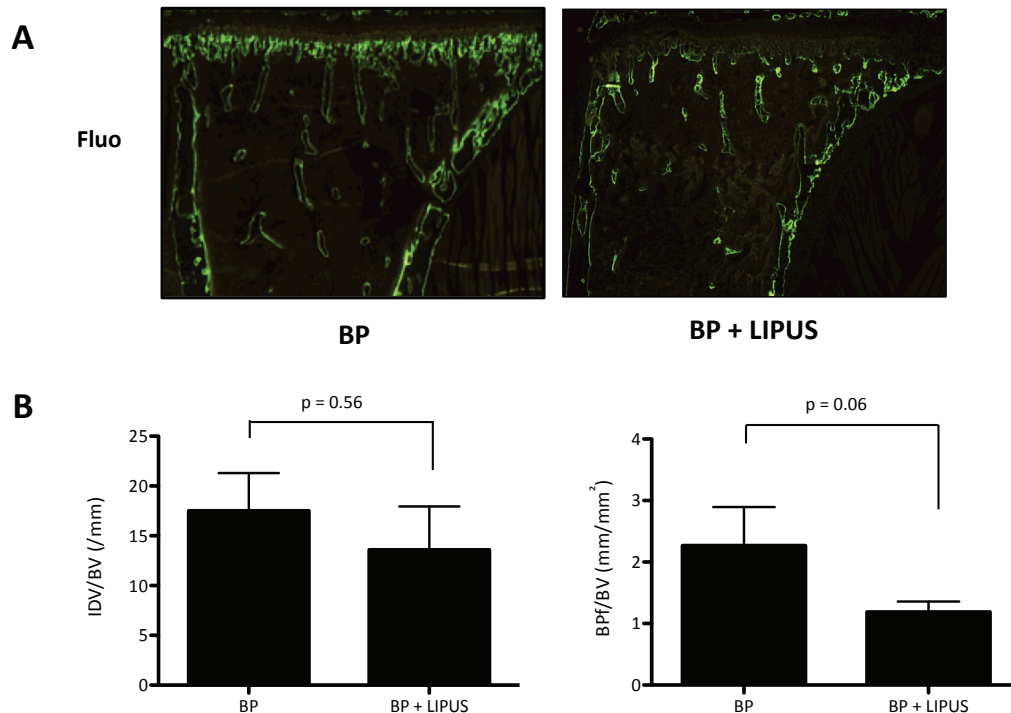


Figure 53 : Quantification du BP fluorescent lié à l'os après un traitement LIPUS

Les souris sont traitées quotidiennement avec des LIPUS pendant 13 jours. (A) Visualisation au microscope à épifluorescence de la fixation du BP fluorescent à l'os. (B) L'intensité de fluorescence mesurée se présente sous la forme d'un ratio entre l'intensité de fluorescence rapportée au volume osseux (IDV/BV). Les surfaces marquées (BPf ; en mm) sont mesurées et présentées sous la forme d'un ratio entre les surfaces marquées par le bisphosphonate fluorescent et le volume osseux (BV ; mm²). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism. Un test bilatéral de Wilcoxon a été utilisé avec un niveau de significativité fixé à 0.05.

Les traitements par LIPUS combinés au ZOL ont également été testés sur un modèle de tumeur mammaire sous-cutanée. L'évolution des volumes tumoraux a été suivie pendant 8 jours lors d'un premier protocole puis pendant 15 jours lors d'un second protocole. Dans les deux cas, les tumeurs ont été prélevées afin de pouvoir réaliser une analyse immuno-histochimique.

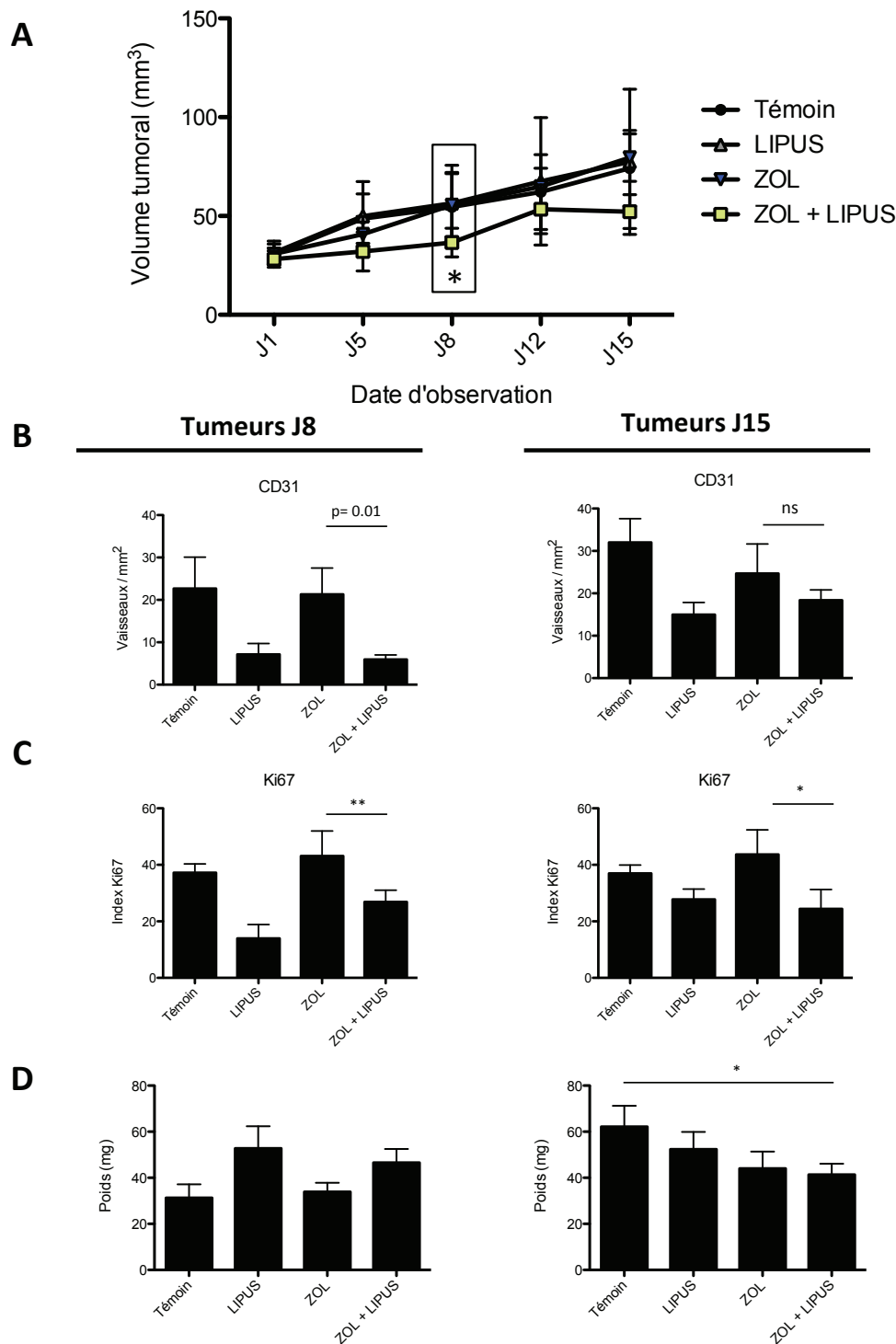


Figure 54 : Evolution d'une tumeur sous-cutanée traitée par LIPUS et ZOL

Les souris ont reçu une injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231/B02. Lorsque le volume des tumeurs a atteint 30 mm³, les souris ont reçu une dose de ZOL en combinaison ou pas avec des LIPUS. (A) Evolution du volume tumoral entre J0 et J15. *: p < 0.01. (B) Analyse immuno-histochimique de l'angiogenèse (CD31) à J8 (*panel de gauche*) et à J15 (*panel de droite*) (C) Analyse de la prolifération tumorale Ki-67 à J8 (*panel de gauche*) et J15 (*panel de droite*). (D) Pesée des tumeurs lors des prélèvements à J8 (*panel de gauche*) et à J15 (*panel de droite*). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne ± SEM. L'analyse statistique est basée sur des tests bilatéraux de Wilcoxon. *: p < 0.05. **: p < 0.01.

Jusqu'au 8^{ème} jour de traitement, les volumes tumoraux mesurés dans le groupe ZOL + LIPUS demeurent significativement plus faibles que ceux du groupe ZOL seul ($p < 0.01$) ainsi que par rapport aux groupes témoin ($p < 0.05$) et LIPUS ($p < 0.05$). Les observations faites à J15 ne montrent aucune différence entre tous ces groupes suggérant que l'effet sur la tumeur du ZOL associé à des LIPUS a diminué au court du temps (**Figure 54-A**). Ce résultat est appuyé par la diminution de l'angiogenèse dans les groupes LIPUS et ZOL + LIPUS par rapport aux groupes témoin et ZOL ($p < 0.01$) à J8 ainsi que par une baisse de la prolifération tumorale entre les groupes ZOL et ZOL + LIPUS ($p < 0.01$) (**Figure 54-B&C**). Cependant, à J15, l'analyse immuno-histochimique des tumeurs ne permet pas de mettre en évidence de différence concernant le groupe ZOL + LIPUS (**Figure 54-B**). La prolifération des cellules tumorales demeure en revanche plus faible dans ce groupe par rapport au groupe ZOL ($p < 0.05$) (**Figure 54-C**). Ces résultats ne sont cependant pas retrouvés au niveau du poids des tumeurs à J8 et à J15 (**Figure 54-D**).

En conclusion, les LIPUS seuls ne permettent pas de diminuer les lyses osseuses et la masse tumorale, en situation de métastases osseuses. Combiner le ZOL avec un traitement LIPUS répété quotidiennement induit une baisse des lyses osseuses mais non statistiquement significative. De manière intéressante, une diminution des surfaces marquées par le BP fluorescent a été notée suggérant un effet des LIPUS seuls sur la désorption du BP hors de l'os. Cet effet a été confirmé sur un modèle de tumeurs sous-cutanées. Cependant, si l'effet du ZOL en combinaison avec les LIPUS est avéré en début de traitement (jusqu'au 8^{ème} jour), il diminue jusqu'à ne plus être significatif sur les observations faites à J15.

II) EFFETS DES LIPUS EN SITUATION NEO-ADJUVANTE

L'efficacité des LIPUS a été évaluée dans une situation néo-adjuvante. Brièvement, les souris Balb c ont reçu une injection de cellules tumorales 4T1 dans la glande mammaire. Lorsque le volume tumoral est proche de 50 mm³ (environ 7 jours après l'injection), les animaux ont été répartis dans différents groupes de traitement : témoin, LIPUS, ZOL, ZOL + LIPUS, Dox, Dox + LIPUS, Dox + ZOL et Dox + ZOL + LIPUS. Les animaux ont ainsi reçu, selon leur groupe, une dose de Dox (2 mg/kg), injectée par voie intra-péritonéale, éventuellement suivie d'un traitement aux LIPUS. Le 8^{ème} jour, les animaux ont reçu une dose clinique de ZOL (correspondante aux 4 mg/kg injectés en clinique). Les traitements LIPUS ont été répétés jusqu'au 14^{ème} jour inclus.

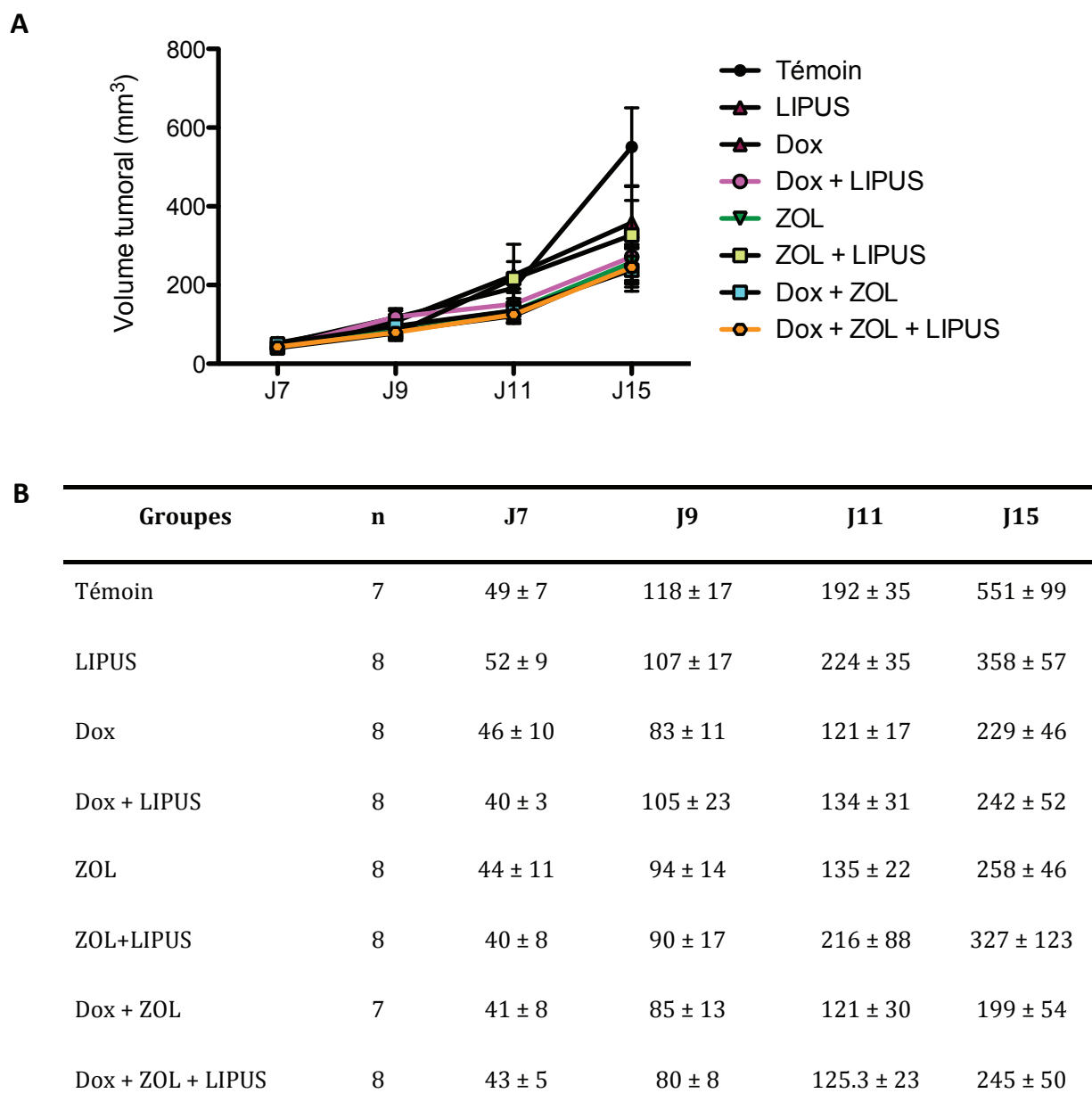


Figure 55 : Tumeurs 4T1 traitées avec de la Dox, du ZOL et des LIPUS

Les souris ont reçu une injection de cellules 4T1 dans la glande mammaire à J0. Le volume tumoral a été mesuré à J7, J9, J11 et J15. (A) Evolution du volume tumoral entre J7 et J15. Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne (en mm³) ± SEM. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism. Une comparaison entre les groupes a été effectuée avec des tests bilatéraux de Wilcoxon. $\alpha = 0.05$. (B) Volumes tumoraux mesurés à J7, J9, J11 et J15. n correspond au nombre d'animaux inclus dans l'étude. Témoin : injection de PBS à J7 et J8 ; LIPUS : traitements LIPUS entre J7 et J14 ; Dox : injection de Dox à J7 ; Dox + LIPUS : injection de Dox à J7 suivie d'un traitement LIPUS à J7 puis entre J8 et J14 ; ZOL : injection de ZOL à J8 ; ZOL + LIPUS : injection de ZOL à J8 et LIPUS entre J7 et J14 ; Dox + ZOL : injection de Dox à J7 et injection de ZOL à J8 ; Dox + ZOL + LIPUS : injection de Dox à J7, injection de ZOL à J8 et LIPUS entre J7 et J14.

Le volume tumoral des animaux a été mesuré avec un pied à coulisses et évalué régulièrement entre le premier jour des traitements (J7) et le dernier (J15) (**Figure 55**). Aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes de traitement à J7 (**Figure 55-**

A). Les LIPUS seuls n'affectent pas la croissance tumorale à J15 par rapport au groupe témoin ($p=0.30$). Aucune différence significative n'a été notée entre les groupes Dox et Dox + LIPUS à tout moment du protocole, suggérant que les LIPUS n'ont pas favorisé la délivrance de Dox au sein de la tumeur mammaire. Un traitement combiné au ZOL et aux LIPUS ne permet également pas d'affecter le volume tumoral à J15 par rapport au groupe ZOL seul ($p=0.70$). Enfin, l'injection de ZOL consécutive à celle de Dox associée à des LIPUS n'a pas permis d'affecter la croissance tumorale à J15 ($p=1$).

Les tumeurs mammaires ont été prélevées à J15 et pesées (**Figure 56**). Aucune différence n'a été mise en évidence entre tous les groupes confirmant les résultats obtenus précédemment sur le volume tumoral.

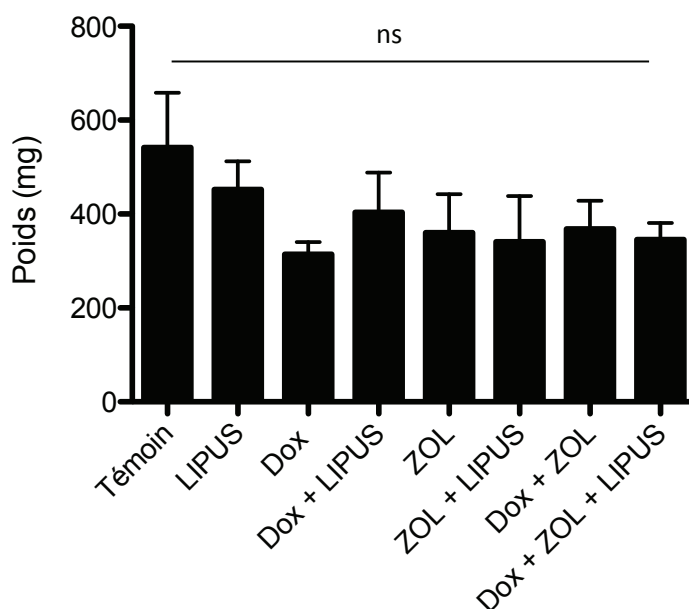


Figure 56 : Poids de la tumeur primaire mammaire suite à un traitement LIPUS

Les tumeurs ont été récupérées à J15 et pesées. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM et analysés avec le logiciel GraphPad Prism, en utilisant un test bilatéral de Wilcoxon.

Une analyse immuno-histochimique a été réalisée afin d'évaluer l'angiogenèse et la prolifération des tumeurs mammaires. Le nombre de vaisseaux présent au sein des tumeurs mammaires ne diffère pas entre les groupes (**Figure 57-A**). Il n'y a pas, non plus de différence statistiquement significative sur l'index Ki-67 (**Figure 57-B**). De même, aucun effet n'a été mis en évidence pour les groupes traités en associant de la Dox et du ZOL en combinaison ou pas avec des LIPUS. Ces résultats appuient ceux obtenus concernant le volume tumoral à J15.

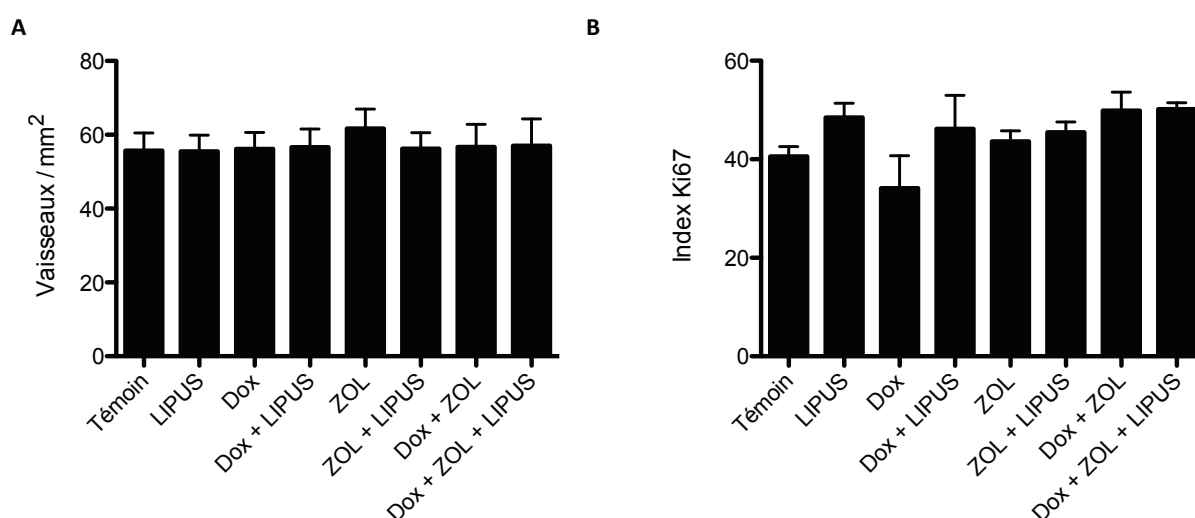


Figure 57 : Immunohistochimie des tumeurs 4T1 après un traitement LIPUS

Les tumeurs récupérées à J15 après les traitements chimiques et ultrasonores ont été incluses en paraffine et coupées au moyen d'un microtome. (A) Analyse de la prolifération tumorale. L'index Ki-67 correspond à un ratio entre le nombre de cellules en état de prolifération et le nombre total de cellules. Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM. (B) Analyse de l'angiogenèse tumorale réalisée avec un marquage épithélial CD31. Les vaisseaux sanguins sont comptabilisés et rapportés à la surface tumorale (en mm²). Les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm SEM.

Ces expériences, réalisées *in vivo*, démontrent un intérêt des LIPUS sur les modèles de métastase osseuse et de tumeurs sous-cutanées où une baisse de l'activité des ostéoclastes et de la prolifération tumorale ont été respectivement observées. Les observations faites à J15 soulignent la perte d'efficacité du traitement au fil du temps, probablement en raison de la quantité de ZOL biodisponible qui diminue. Cette hypothèse est appuyée par la diminution de l'angiogenèse, effective à J8 mais qui n'est pas retrouvée à J15 et également par la quantification du BP fluorescent restant dans les pattes au terme du traitement.

L'effet combiné des LIPUS avec la Dox sur les cellules 4T1, bien qu'avéré *in vitro*, n'a pas été retrouvé sur des tumeurs mammaires de la même lignée.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

I) LISTE DES PUBLICATIONS

Low Intensity Ultrasound Promote Clathrin Dependent-Endocytosis for Drug Penetration in Tumor Cells. *Tardoski S, Gineyts E, Ngo J, Kocot A, Clezardin P, Melodelima D.* Ultrasound in Medicine and Biology. Oct. 2015 ; 41(10)2740-54.

Low Intensity Continuous Ultrasound Triggers Effective Bisphosphonate Anticancer Activity in Breast Cancer. *Tardoski S, Ngo J, Gineyts E, Roux JP, Clezardin P, Melodelima D.* Scientific Reports. Accepté. Septembre 2015.

II) LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Communications lors de congrès internationaux

1) Drug Delivery of Non-Encapsulated Drugs by Ultrasound: Involvement of Clathrin-Mediated Endocytosis (oral)

S.Tardoski, E.Gineyts, J.Ngo, A.Kocot, P.Clezardin, D.Melodelima

International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2015, Utrecht, The Netherlands, 15-18 avril 2015

2) Low Intensity Continuous Ultrasound Triggers Anti-Tumoral Effect in Breast Cancer Xenografts and Bone Metastasis (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, J.P. Roux, P.Clézardin, D.Melodelima

International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2015, Utrecht, The Netherlands, 15-18 avril 2015

3) Study of Factors affecting the Drug Delivery when using Low Intensity Ultrasound (oral)

S.Tardoski, E.Gineyts, A.Kocot, P.Clézardin, **D.Melodelima**

IEEE International Ultrasonics Symposium, Chicago, 3-6 septembre 2014

4) Low Intensity Continuous Ultrasound to Enhance the Delivery of Bisphosphonates in Tumor Cells (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, **D.Melodelima**

IEEE International Ultrasonics Symposium, Chicago, 3-6 septembre 2014

5) Low Intensity Continuous Ultrasound and a Clinical Dosing Regimen of Zoledronate Produce Antitumor Effects in Mouse Models of Breast Tumor Xenograft and Bone Metastasis (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2014, Las Vegas, 2-5 avril 2014

6) Low Intensity Continuous Ultrasound Promotes Antitumor Effects of a Clinical Dosing Regimen of Bisphosphonate in Animal Models of Breast Tumor Xenograft and bone metastasis (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima
Cancer-Induced Bone Disease 2013, Miami, 6-9 novembre 2013

7) Delivery of Zoledronate is Highly Improved by Low Intensity Continuous Ultrasound in a Breast Cancer Bone Metastases Model (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima
IEEE International Ultrasonics Symposium 2013, Prague, 21-25 juillet 2013

8) Low Intensity Continuous Ultrasound Enhances Drug Delivery of Zoledronic Acid in a Breast Cancer Bone Metastases Mouse Model (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima
International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2013, Shanghai, 12-15 mai 2013

9) Zoledronic acid Combined with an Ultrasound Treatment Achieves Antitumoral Effect in Breast Cancer Bone Metastases (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, P.Clézardin, D.Melodelima
Cancer-Induced Bone Disease 2012, Lyon, 15-17 novembre 2012

10) Low Intensity Ultrasound Enhances the Bioavailability of a Bisphosphonate in a Breast Cancer Bone Metastases Animal Model (poster)

S.Tardoski, D.Melodelima, J.Ngo, P.Clézardin
IEEE International Ultrasonics Symposium 2012, Dresden, 7-10 octobre 2012

11) Low Intensity Ultrasound Associated with Bisphosphonate Zoledronic Acid Decrease Osteolytic Lesions in Breast Cancer Bone Metastases (poster)

S.Tardoski, **D.Melodelima**, J.Ngo, D.Goehrig, P.Clézardin
International Symposium on Therapeutic Ultrasound 2012, Heildelberg, 10-13 juin 2012

12) Efficacy of Bisphosphonate Zoledronic Acid is Substantially Improved by Low Intensity Ultrasound in the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases in Animals (oral)

S.Tardoski, D.Melodelima, J.Ngo, D.Goehrig, P.Clézardin
Acoustics 2012, Nantes, 23-27 avril 2012

13) Efficacy of Zoledronic Acid Is Substantially Improved by Low Intensity Ultrasound in the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases in Animals (poster)

S.Tardoski, D.Melodelima, J.Ngo, D.Goehrig, P.Clézardin
Cancer-Induced Bone Disease 2011, Chicago, 30 novembre - 3 décembre 2011

14) Low Intensity Ultrasound Substantially Improves the Efficacy of Bisphosphonate Zoledronic Acid in the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases in Animals (oral)

D.Melodelima, S.Tardoski, J.Ngo, D.Goehrig, P.Clézardin
IEEE International Ultrasonics Symposium 2011, Orlando, 18-21 octobre 2011

B. Communications lors de congrès nationaux et journées scientifiques

1) Delivery of a Bisphosphonate is Improved by Low Intensity Continuous Ultrasound in Mouse Models of Breast Tumor Xenograft and Bone Metastasis (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

Journée Structure Fédératrice de Recherche 2014, Lyon, 16 décembre 2014

2) Low Intensity Continuous Ultrasound Enhance in vivo the Delivery of Bisphosphonates in Tumor Cells (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

Journée de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé, Lyon, 16 octobre 2014

3) Delivery of a Bisphosphonate is Improved by Low-Intensity Ultrasound in Mouse Models of Breast Tumor Xenograft and Bone Metastasis (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, Lyon, 17-18 juin 2014

4) Delivery of Zoledronate is Highly Improved by Low Intensity Ultrasound (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

Journée de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé, Lyon, 3 octobre 2013

5) Traitement des Métastases Osseuses par Ultrasons de Faible Intensité et Zolédronate (oral)

S.Tardoski, J.Ngo, E.Gineyts, P.Clézardin, D.Melodelima

Journée Structure Fédératrice de Recherche 2013, Lyon, 5 septembre 2013

6) Zoledronic Acid Delivery is Substantially Enhanced by Low Intensity Continuous Ultrasound in a Breast Cancer Bone Metastases Mouse Model (poster)

S.Tardoski, J.Ngo, P.Clézardin, D.Melodelima

Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, Lyon, 21-22 mars 2013

7) Traitement des Métastases Osseuses par Ultrasons et Zolédronate (oral)

S.Tardoski, D.Melodelima, J.Ngo, P.Clézardin

Journée de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé 2012, Lyon, 18 octobre 2012

8) Improvement of Bisphosphonate Zoledronic Acid Bioavailability using Low Intensity Ultrasound in the Treatment of Breast Cancer Bone Metastases (poster)

S.Tardoski, D.Melodelima, J.Ngo, D.Goehrig, P.Clézardin

Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, Lyon, 20-21 mars 2012

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Taichman RS (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105(7):2631-2639.
2. Yoneda T (1997) Arterial microvascularization and breast cancer colonization in bone. *Histology and histopathology* 12(4):1145-1149.
3. Ilvesaro J, Metsikko K, Vaananen K, & Tuukkanen J (1999) Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14(8):1338-1344.
4. Pittenger MF, *et al.* (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-147.
5. Hay E, *et al.* (2000) N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *Journal of cellular physiology* 183(1):117-128.
6. Chen G, Deng C, & Li YP (2012) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences* 8(2):272-288.
7. Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, & Fox SW (1998) Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 13(11):1760-1767.
8. Kobayashi Y, Udagawa N, & Takahashi N (2009) Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 19(1):61-72.
9. Simonet WS, *et al.* (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89(2):309-319.
10. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, & Fortun Y (2004) IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews* 15(1):49-60.
11. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, & Destaing O (2006) Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *European journal of cell biology* 85(3-4):195-202.
12. Neve A, Corrado A, & Cantatore FP (2013) Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of cellular physiology* 228(6):1149-1153.
13. Mundy GR (1993) Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 8 Suppl 2:S505-510.
14. Del Fattore A, Teti A, & Rucci N (2012) Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Frontiers in bioscience* 4:2302-2321.
15. Rucci N (2008) Molecular biology of bone remodelling. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* 5(1):49-56.
16. Turner CH & Pavalko FM (1998) Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaptation. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 3(6):346-355.
17. Bellido T (2014) Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified tissue international* 94(1):25-34.

18. Heino TJ, Hentunen TA, & Vaananen HK (2002) Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *Journal of cellular biochemistry* 85(1):185-197.
19. Everts V, *et al.* (2002) The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(1):77-90.
20. Tang Y, *et al.* (2009) TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature medicine* 15(7):757-765.
21. Binder-Foucard F BA, Delafosse P, Remontet L, Woronoff A-S, Bossard N. (2013) Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides. *Institut de Veille Sanitaire (InVS)*:122p.
22. Carey LA, *et al.* (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama* 295(21):2492-2502.
23. Rupninder Sandhu JSP, Wendell D. Jones, Chad A. Livasy, William B. Coleman (2010) Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy. *Lab Medicine* 41.
24. Paget S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133(3421):571-573.
25. Weilbaecher KN, Guise TA, & McCauley LK (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature reviews. Cancer* 11(6):411-425.
26. Zhang XH, *et al.* (2013) Selection of bone metastasis seeds by mesenchymal signals in the primary tumor stroma. *Cell* 154(5):1060-1073.
27. Karparkin S & Pearlstein E (1981) Role of platelets in tumor cell metastases. *Annals of internal medicine* 95(5):636-641.
28. Kang Y, *et al.* (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer cell* 3(6):537-549.
29. Richert MM, *et al.* (2009) Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncology reports* 21(3):761-767.
30. Clezardin P (2011) [The role of RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) triad in cancer-induced bone diseases: physiopathology and clinical implications]. *Bulletin du cancer* 98(7):837-846.
31. Rucci N, *et al.* (2010) Receptor activator of NF-kappaB ligand enhances breast cancer-induced osteolytic lesions through upregulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147. *Cancer research* 70(15):6150-6160.
32. Terpos E, *et al.* (2004) Autologous stem cell transplantation normalizes abnormal bone remodeling and sRANKL/osteoprotegerin ratio in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 18(8):1420-1426.
33. Bellahcene A, *et al.* (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 101(2):135-148.
34. Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer* 2(8):584-593.
35. Kakonen SM & Mundy GR (2003) Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer* 97(3 Suppl):834-839.
36. Roodman GD (2004) Mechanisms of bone metastasis. *Discovery medicine* 4(22):144-148.
37. Bundred NJ, *et al.* (1992) Parathyroid hormone related protein and skeletal morbidity in breast cancer. *European journal of cancer* 28(2-3):690-692.

38. Pollock JH, Blaha MJ, Lavish SA, Stevenson S, & Greenfield EM (1996) In vivo demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11(6):754-759.
39. Shimo T, *et al.* (2006) Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 21(7):1045-1059.
40. Bendre MS, *et al.* (2003) Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. *Bone* 33(1):28-37.
41. Singh B, Berry JA, Shoher A, & Lucci A (2006) COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells. *The Journal of surgical research* 131(2):267-275.
42. Clines GA & Guise TA (2005) Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocrine-related cancer* 12(3):549-583.
43. Westendorf JJ, Kahler RA, & Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341:19-39.
44. Secondini C, Wetterwald A, Schwaninger R, Thalmann GN, & Cecchini MG (2011) The role of the BMP signaling antagonist noggin in the development of prostate cancer osteolytic bone metastasis. *PloS one* 6(1):e16078.
45. Yin JJ, *et al.* (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *The Journal of clinical investigation* 103(2):197-206.
46. Goya M, *et al.* (2004) Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors. *Cancer research* 64(17):6252-6258.
47. Casimiro S, Guise TA, & Chirgwin J (2009) The critical role of the bone microenvironment in cancer metastases. *Molecular and cellular endocrinology* 310(1-2):71-81.
48. Sanders JL, *et al.* (2000) Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 141(12):4357-4364.
49. Yano S, *et al.* (2004) Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* 35(3):664-672.
50. Bucharaba A, *et al.* (2004) Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 114(12):1714-1725.
51. Bucharaba A, *et al.* (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(25):9643-9648.
52. David M, *et al.* (2010) Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PloS one* 5(3):e9741.
53. Leblanc R, *et al.* (2014) Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin alphaVbeta3 controls metastasis of breast cancer cells to bone. *Blood* 124(20):3141-3150.

54. Aboulafia AJ, Levine AM, Schmidt D, & Aboulafia D (2007) Surgical therapy of bone metastases. *Seminars in oncology* 34(3):206-214.
55. Santiago FR, Del Mar Castellano Garcia M, Montes JL, Garcia MR, & Fernandez JM (2009) Treatment of bone tumours by radiofrequency thermal ablation. *Current reviews in musculoskeletal medicine* 2(1):43-50.
56. Palussiere J, Pellerin-Guignard A, Descat E, Cornelis F, & Dixmerias F (2012) Radiofrequency ablation of bone tumours. *Diagnostic and interventional imaging* 93(9):660-664.
57. Lutz S, *et al.* (2011) Palliative radiotherapy for bone metastases: an ASTRO evidence-based guideline. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 79(4):965-976.
58. Howell DD, *et al.* (2013) Single-fraction radiotherapy versus multifraction radiotherapy for palliation of painful vertebral bone metastases-equivalent efficacy, less toxicity, more convenient: a subset analysis of Radiation Therapy Oncology Group trial 97-14. *Cancer* 119(4):888-896.
59. Reddy EK, Robinson RG, & Mansfield CM (1986) Strontium 89 for palliation of bone metastases. *Journal of the National Medical Association* 78(1):27-32.
60. Sartor O (2004) Overview of samarium sm 153 lexidronam in the treatment of painful metastatic bone disease. *Reviews in urology* 6 Suppl 10:S3-S12.
61. Sartor O, *et al.* (2004) Samarium-153-Lexidronam complex for treatment of painful bone metastases in hormone-refractory prostate cancer. *Urology* 63(5):940-945.
62. Gartrell BA & Saad F (2014) Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* 11(6):335-345.
63. El-Amm J & Aragon-Ching JB (2015) Radium-223 for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *OncoTargets and therapy* 8:1103-1109.
64. Casas A, Llombart A, & Martin M (2013) Denosumab for the treatment of bone metastases in advanced breast cancer. *Breast* 22(5):585-592.
65. Body JJ (2012) Denosumab for the management of bone disease in patients with solid tumors. *Expert review of anticancer therapy* 12(3):307-322.
66. Cummings SR, *et al.* (2009) Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine* 361(8):756-765.
67. Lipton A, *et al.* (2007) Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(28):4431-4437.
68. Coleman R, Gnant M, Morgan G, & Clezardin P (2012) Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *Journal of the National Cancer Institute* 104(14):1059-1067.
69. Aapro MS (2011) Denosumab for bone metastases from breast cancer: a new therapy option? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(14):e419-420; author reply e421-414.
70. Perazella MA & Markowitz GS (2008) Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney international* 74(11):1385-1393.
71. Duong le T, Wesolowski GA, Leung P, Oballa R, & Pickarski M (2014) Efficacy of a cathepsin K inhibitor in a preclinical model for prevention and treatment of breast cancer bone metastasis. *Molecular cancer therapeutics* 13(12):2898-2909.
72. Abdulkadyrov KM, *et al.* (2014) Sotatercept in patients with osteolytic lesions of multiple myeloma. *British journal of haematology* 165(6):814-823.

73. Lotinun S, Pearsall RS, Horne WC, & Baron R (2012) Activin receptor signaling: a potential therapeutic target for osteoporosis. *Current molecular pharmacology* 5(2):195-204.
74. Mantyh P (2013) Bone cancer pain: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Pain* 154 Suppl 1:S54-62.
75. Hosking DJ, Bijvoet OL, van Aken J, & Will EJ (1976) Paget's bone disease treated with diphosphonate and calcitonin. *Lancet* 1(7960):615-617.
76. Heaney RP & Saville PD (1976) Etidronate disodium in postmenopausal osteoporosis. *Clinical pharmacology and therapeutics* 20(5):593-604.
77. van Breukelen FJ, Bijvoet OL, & van Oosterom AT (1979) Inhibition of osteolytic bone lesions by (3-amino-1-hydroxypropylidene)-1, 1-bisphosphonate (A.P.D.). *Lancet* 1(8120):803-805.
78. Raisz LG (1980) New diphosphonates to block bone resorption. *The New England journal of medicine* 302(6):347-348.
79. Ebtino FH, *et al.* (2011) The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone* 49(1):20-33.
80. van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, & Papapoulos S (1994) Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9(12):1875-1882.
81. Russell RG, *et al.* (2007) Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1117:209-257.
82. Lin JH (1996) Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 18(2):75-85.
83. Chang JT, Green L, & Beitz J (2003) Renal failure with the use of zoledronic acid. *The New England journal of medicine* 349(17):1676-1679; discussion 1676-1679.
84. Cremers SC, Pillai G, & Papapoulos SE (2005) Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clinical pharmacokinetics* 44(6):551-570.
85. Cremers SC, *et al.* (2003) Relationships between pharmacokinetics and rate of bone turnover after intravenous bisphosphonate (olpadronate) in patients with Paget's disease of bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(5):868-875.
86. Morales-Piga A (1999) Tiludronate. A new treatment for an old ailment: Paget's disease of bone. *Expert opinion on pharmacotherapy* 1(1):157-170.
87. Coxon FP, Thompson K, Roelofs AJ, Ebtino FH, & Rogers MJ (2008) Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone* 42(5):848-860.
88. Monkkonen J & Ylitalo P (1990) The tissue distribution of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) in mice. The effects of vehicle and the route of administration. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 15(3):239-243.
89. Rogers MJ, *et al.* (1997) Inhibition of growth of Dictyostelium discoideum amoebae by bisphosphonate drugs is dependent on cellular uptake. *Pharmaceutical research* 14(5):625-630.
90. Felix R, Guenther HL, & Fleisch H (1984) The subcellular distribution of [14C]dichloromethylenebisphosphonate and [14C]1-hydroxyethylidene-1,1-bisphosphonate in cultured calvaria cells. *Calcified tissue international* 36(1):108-113.

91. Thompson K, Rogers MJ, Coxon FP, & Crockett JC (2006) Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Molecular pharmacology* 69(5):1624-1632.
92. van Beek ER, Lowik CW, Ebetino FH, & Papapoulos SE (1998) Binding and antiresorptive properties of heterocycle-containing bisphosphonate analogs: structure-activity relationships. *Bone* 23(5):437-442.
93. Roelofs AJ, *et al.* (2009) Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *British journal of haematology* 144(2):245-250.
94. Sadr-Eshkevari P, *et al.* (2014) Bisphosphonates and connexin 43: a critical review of evidence. *Cell communication & adhesion* 21(5):241-247.
95. van Beek ER, *et al.* (2003) Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone* 33(5):805-811.
96. Kavanagh KL, *et al.* (2006) The molecular mechanism of nitrogen-containing bisphosphonates as antiosteoporosis drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(20):7829-7834.
97. Monkkonen H, *et al.* (2006) A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British journal of pharmacology* 147(4):437-445.
98. Major PP & Coleman RE (2001) Zoledronic acid in the treatment of hypercalcemia of malignancy: results of the international clinical development program. *Seminars in oncology* 28(2 Suppl 6):17-24.
99. Body JJ (2006) Bisphosphonates for malignancy-related bone disease: current status, future developments. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 14(5):408-418.
100. Rosen LS, *et al.* (2001) Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blind, comparative trial. *Cancer journal* 7(5):377-387.
101. Diel IJ, *et al.* (2004) Improved quality of life after long-term treatment with the bisphosphonate ibandronate in patients with metastatic bone disease due to breast cancer. *European journal of cancer* 40(11):1704-1712.
102. Body JJ, *et al.* (2004) Oral ibandronate reduces the risk of skeletal complications in breast cancer patients with metastatic bone disease: results from two randomised, placebo-controlled phase III studies. *British journal of cancer* 90(6):1133-1137.
103. Kanis JA, Powles T, Paterson AH, McCloskey EV, & Ashley S (1996) Clodronate decreases the frequency of skeletal metastases in women with breast cancer. *Bone* 19(6):663-667.
104. Hillner BE, Weeks JC, Desch CE, & Smith TJ (2000) Pamidronate in prevention of bone complications in metastatic breast cancer: a cost-effectiveness analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18(1):72-79.
105. Rosen LS, *et al.* (2004) Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 100(12):2613-2621.
106. Saad F, *et al.* (2004) Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96(11):879-882.

107. Lipton A, *et al.* (2002) The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: a comparison to pamidronate. *Cancer investigation* 20 Suppl 2:45-54.
108. Ali SM, *et al.* (2001) Safety and efficacy of bisphosphonates beyond 24 months in cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19(14):3434-3437.
109. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, & Engroff SL (2004) Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 62(5):527-534.
110. Khan A (2008) Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 54(7):1019-1021.
111. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, & Broumand V (2005) Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 63(11):1567-1575.
112. Lipton A, Cook RJ, Major P, Smith MR, & Coleman RE (2007) Zoledronic acid and survival in breast cancer patients with bone metastases and elevated markers of osteoclast activity. *The oncologist* 12(9):1035-1043.
113. Sanfilippo KM, *et al.* (2015) Comparative effectiveness on survival of zoledronic acid versus pamidronate in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 56(3):615-621.
114. Boissier S, *et al.* (1997) Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer research* 57(18):3890-3894.
115. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, & Colston KW (2004) Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *BJU international* 94(1):164-170.
116. Corso A, *et al.* (2005) Zoledronic acid down-regulates adhesion molecules of bone marrow stromal cells in multiple myeloma: a possible mechanism for its antitumor effect. *Cancer* 104(1):118-125.
117. Corso A, Ferretti E, & Lazzarino M (2005) Zoledronic acid exerts its antitumor effect in multiple myeloma interfering with the bone marrow microenvironment. *Hematology* 10(3):215-224.
118. Bellahcene A, Chaplet M, Bonjean K, & Castronovo V (2007) Zoledronate inhibits alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin cell surface expression in endothelial cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 14(2):123-130.
119. Bezzi M, Hasmim M, Bieler G, Dormond O, & Ruegg C (2003) Zoledronate sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-induced programmed cell death: evidence for the suppression of sustained activation of focal adhesion kinase and protein kinase B/Akt. *The Journal of biological chemistry* 278(44):43603-43614.
120. Boissier S, *et al.* (2000) Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer research* 60(11):2949-2954.
121. Winter MC, Holen I, & Coleman RE (2008) Exploring the anti-tumour activity of bisphosphonates in early breast cancer. *Cancer treatment reviews* 34(5):453-475.
122. Virtanen SS, Vaananen HK, Harkonen PL, & Lakkakorpi PT (2002) Alendronate inhibits invasion of PC-3 prostate cancer cells by affecting the mevalonate pathway. *Cancer research* 62(9):2708-2714.

123. Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, & Soria C (2003) New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *British journal of cancer* 88(10):1631-1640.
124. Sawada K, *et al.* (2002) Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through Rho/Rho-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology* 87(3):252-259.
125. Heikkila P, *et al.* (2002) Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anti-cancer drugs* 13(3):245-254.
126. Clezardin P, Fournier P, Boissier S, & Peyruchaud O (2003) In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. *Current medicinal chemistry* 10(2):173-180.
127. Green JR (2003) Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97(3 Suppl):840-847.
128. Wada A, *et al.* (2006) Pamidronate induced anti-proliferative, apoptotic, and anti-migratory effects in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 44(1):142-150.
129. Yamagishi S, *et al.* (2004) Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *The American journal of pathology* 165(6):1865-1874.
130. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, & Sugimoto C (2003) PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22(56):8983-8998.
131. Cox AD & Der CJ (2003) The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22(56):8999-9006.
132. Tassone P, *et al.* (2003) Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. *British journal of cancer* 88(12):1971-1978.
133. Ory B, Moriceau G, Redini F, & Heymann D (2007) mTOR inhibitors (rapamycin and its derivatives) and nitrogen containing bisphosphonates: bi-functional compounds for the treatment of bone tumours. *Current medicinal chemistry* 14(13):1381-1387.
134. Monkkonen H, *et al.* (2008) Bisphosphonate-induced ATP analog formation and its effect on inhibition of cancer cell growth. *Anti-cancer drugs* 19(4):391-399.
135. Evdokiou A, Labrinidis A, Bouralexis S, Hay S, & Findlay DM (2003) Induction of cell death of human osteogenic sarcoma cells by zoledronic acid resembles anoikis. *Bone* 33(2):216-228.
136. Iguchi T, Miyakawa Y, Yamamoto K, Kizaki M, & Ikeda Y (2003) Nitrogen-containing bisphosphonates induce S-phase cell cycle arrest and apoptosis of myeloma cells by activating MAPK pathway and inhibiting mevalonate pathway. *Cellular signalling* 15(7):719-727.
137. Forsea AM, Muller C, Riebeling C, Orfanos CE, & Geilen CC (2004) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit cell cycle progression in human melanoma cells. *British journal of cancer* 91(4):803-810.
138. Fournier P, *et al.* (2002) Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer research* 62(22):6538-6544.
139. Wood J, *et al.* (2002) Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302(3):1055-1061.
140. Hashimoto K, *et al.* (2007) Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 354(2):478-484.

141. Tang X, *et al.* (2010) Bisphosphonates suppress insulin-like growth factor 1-induced angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathways in human breast cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126(1):90-103.
142. Okamoto T, *et al.* (2002) Incadronate disodium inhibits advanced glycation end products-induced angiogenesis in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 297(2):419-424.
143. Giraudo E, Inoue M, & Hanahan D (2004) An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 114(5):623-633.
144. Coscia M, *et al.* (2010) Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* 14(12):2803-2815.
145. Santini D, *et al.* (2002) Pamidronate induces modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8(5):1080-1084.
146. Santini D, *et al.* (2003) Zoledronic acid induces significant and long-lasting modifications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(8):2893-2897.
147. Stresing V, Daubine F, Benzaid I, Monkkinen H, & Clezardin P (2007) Bisphosphonates in cancer therapy. *Cancer letters* 257(1):16-35.
148. Clezardin P (2011) Bisphosphonates' antitumor activity: an unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone* 48(1):71-79.
149. Kunzmann V, *et al.* (2000) Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96(2):384-392.
150. Benzaid I, *et al.* (2011) High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer research* 71(13):4562-4572.
151. Benzaid I, Monkkinen H, Bonnelye E, Monkkinen J, & Clezardin P (2012) In vivo phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors trigger Vgamma9Vdelta2 T-cell antitumor cytotoxicity through ICAM-1 engagement. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18(22):6249-6259.
152. Zheng BJ, *et al.* (2001) Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 92(3):421-425.
153. Kondo M, *et al.* (2008) Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional gammadelta T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 10(8):842-856.
154. Abe Y, *et al.* (2009) Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated Vgamma9gammadelta T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Experimental hematology* 37(8):956-968.
155. Ottewell PD, *et al.* (2008) Differential effect of doxorubicin and zoledronic acid on intraosseous versus extraosseous breast tumor growth in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14(14):4658-4666.
156. Ottewell PD, *et al.* (2008) Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 100(16):1167-1178.

157. Ottewell PD, *et al.* (2010) Sustained inhibition of tumor growth and prolonged survival following sequential administration of doxorubicin and zoledronic acid in a breast cancer model. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126(2):522-532.
158. Aft R, *et al.* (2010) Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: an open label, randomised, phase 2 trial. *The lancet oncology* 11(5):421-428.
159. Neville-Webbe HL & Coleman RE (2010) Bisphosphonates and RANK ligand inhibitors for the treatment and prevention of metastatic bone disease. *European journal of cancer* 46(7):1211-1222.
160. Diel IJ, *et al.* (2008) Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow: a long-term follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 19(12):2007-2011.
161. Powles T, *et al.* (2006) Reduction in bone relapse and improved survival with oral clodronate for adjuvant treatment of operable breast cancer [ISRCTN83688026]. *Breast cancer research : BCR* 8(2):R13.
162. Coleman RE, *et al.* (2010) The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. *British journal of cancer* 102(7):1099-1105.
163. Coleman RE, *et al.* (2011) Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid. *The New England journal of medicine* 365(15):1396-1405.
164. Eidtmann H, *et al.* (2010) Efficacy of zoledronic acid in postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole: 36-month results of the ZO-FAST Study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21(11):2188-2194.
165. Gnant M, *et al.* (2015) Zoledronic acid combined with adjuvant endocrine therapy of tamoxifen versus anastrozol plus ovarian function suppression in premenopausal early breast cancer: final analysis of the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 12. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 26(2):313-320.
166. Wilson C, Ottewell P, Coleman RE, & Holen I (2015) The differential anti-tumour effects of zoledronic acid in breast cancer - evidence for a role of the activin signaling pathway. *BMC cancer* 15:55.
167. Saussine C (2013) [Extracorporeal shock wave lithotripsy]. *Progres en urologie : journal de l'Association francaise d'urologie et de la Societe francaise d'urologie* 23(14):1168-1171.
168. Crouzet S, *et al.* (2010) Multicentric oncologic outcomes of high-intensity focused ultrasound for localized prostate cancer in 803 patients. *European urology* 58(4):559-566.
169. Pennes HH (1948) Analysis of skin, muscle and brachial arterial blood temperatures in the resting normal human forearm. *The American journal of the medical sciences* 215(3):354.
170. Sapareto SA & Dewey WC (1984) Thermal dose determination in cancer therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 10(6):787-800.
171. Issels RD (2008) Hyperthermia adds to chemotherapy. *European journal of cancer* 44(17):2546-2554.
172. Kaur P, Hurwitz MD, Krishnan S, & Asea A (2011) Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancers* 3(4):3799-3823.

173. Crouzet S, *et al.* (2014) Whole-gland ablation of localized prostate cancer with high-intensity focused ultrasound: oncologic outcomes and morbidity in 1002 patients. *European urology* 65(5):907-914.
174. Sapareto SA (1984) Response to clinical hyperthermia: mirage or reality? *International journal of radiation oncology, biology, physics* 10(6):945.
175. Hynynen K (1991) The threshold for thermally significant cavitation in dog's thigh muscle in vivo. *Ultrasound in medicine & biology* 17(2):157-169.
176. Chapelon JY, *et al.* (1992) In vivo effects of high-intensity ultrasound on prostatic adenocarcinoma Dunning R3327. *Cancer research* 52(22):6353-6357.
177. Holt RG & Roy RA (2001) Measurements of bubble-enhanced heating from focused, MHz-frequency ultrasound in a tissue-mimicking material. *Ultrasound in medicine & biology* 27(10):1399-1412.
178. Schlicher RK, *et al.* (2006) Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound in medicine & biology* 32(6):915-924.
179. Akiyama H, *et al.* (2014) Low-intensity pulsed ultrasound therapy stimulates callus formation between host femur and cortical onlay strut allograft. *Ultrasound in medicine & biology* 40(6):1197-1203.
180. Kennedy JE, *et al.* (2004) High-intensity focused ultrasound for the treatment of liver tumours. *Ultrasonics* 42(1-9):931-935.
181. Dupre A, *et al.* (2015) First Clinical Experience of Intra-Operative High Intensity Focused Ultrasound in Patients with Colorectal Liver Metastases: A Phase I-IIa Study. *PloS one* 10(2):e0118212.
182. Xie B, *et al.* (2010) Experimental ablation of the pancreas with high intensity focused ultrasound (HIFU) in a porcine model. *International journal of medical sciences* 8(1):9-15.
183. Aptel F, *et al.* (2011) Miniaturized high-intensity focused ultrasound device in patients with glaucoma: a clinical pilot study. *Investigative ophthalmology & visual science* 52(12):8747-8753.
184. Shaw CJ, ter Haar GR, Rivens IH, Giussani DA, & Lees CC (2014) Pathophysiological mechanisms of high-intensity focused ultrasound-mediated vascular occlusion and relevance to non-invasive fetal surgery. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11(95):20140029.
185. Hurwitz MD, *et al.* (2014) Magnetic resonance-guided focused ultrasound for patients with painful bone metastases: phase III trial results. *Journal of the National Cancer Institute* 106(5).
186. Li C, *et al.* (2010) Noninvasive treatment of malignant bone tumors using high-intensity focused ultrasound. *Cancer* 116(16):3934-3942.
187. Napoli A, *et al.* (2013) Primary pain palliation and local tumor control in bone metastases treated with magnetic resonance-guided focused ultrasound. *Investigative radiology* 48(6):351-358.
188. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, & Kilcoyne RF (1994) Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 76(1):26-34.
189. Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, & Roe LR (1997) Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 79(7):961-973.
190. Schofer MD, Block JE, Aigner J, & Schmelz A (2010) Improved healing response in delayed unions of the tibia with low-intensity pulsed ultrasound: results of a randomized sham-controlled trial. *BMC musculoskeletal disorders* 11:229.

191. Nolte PA, *et al.* (2001) Low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. *The Journal of trauma* 51(4):693-702; discussion 702-693.
192. Birnbaum K, Wirtz DC, Siebert CH, & Heller KD (2002) Use of extracorporeal shock-wave therapy (ESWT) in the treatment of non-unions. A review of the literature. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 122(6):324-330.
193. Wang CJ, *et al.* (2008) Extracorporeal shockwave therapy shows regeneration in hip necrosis. *Rheumatology* 47(4):542-546.
194. Wang CJ, *et al.* (2003) Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 21(6):984-989.
195. Ma HZ, Zeng BF, & Li XL (2007) Upregulation of VEGF in subchondral bone of necrotic femoral heads in rabbits with use of extracorporeal shock waves. *Calcified tissue international* 81(2):124-131.
196. Padilla F, Puts R, Vico L, & Raum K (2014) Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics* 54(5):1125-1145.
197. Lu H, *et al.* (2009) Identification of genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound stimulations. *Biochemical and biophysical research communications* 378(3):569-573.
198. Li JG, Chang WH, Lin JC, & Sun JS (2002) Optimum intensities of ultrasound for PGE(2) secretion and growth of osteoblasts. *Ultrasound in medicine & biology* 28(5):683-690.
199. Reher P, Harris M, Whiteman M, Hai HK, & Meghji S (2002) Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E2 production by human osteoblasts. *Bone* 31(1):236-241.
200. Nakamura T, *et al.* (2011) Low-intensity pulsed ultrasound reduces the inflammatory activity of synovitis. *Annals of biomedical engineering* 39(12):2964-2971.
201. Doan N, Reher P, Meghji S, & Harris M (1999) In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 57(4):409-419; discussion 420.
202. Zhou S, *et al.* (2004) Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 279(52):54463-54469.
203. Kumagai K, *et al.* (2012) Low-intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing by stimulation of recruitment of both local and circulating osteogenic progenitors. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 30(9):1516-1521.
204. Bandow K, *et al.* (2007) Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) induces RANKL, MCP-1, and MIP-1beta expression in osteoblasts through the angiotensin II type 1 receptor. *Journal of cellular physiology* 211(2):392-398.
205. Wang FS, *et al.* (2004) Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1alpha activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts. *Bone* 35(1):114-123.
206. Naruse K, Miyauchi A, Itoman M, & Mikuni-Takagaki Y (2003) Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 18(2):360-369.
207. Suzuki A, *et al.* (2009) Daily low-intensity pulsed ultrasound stimulates production of bone morphogenetic protein in ROS 17/2.8 cells. *Journal of oral science* 51(1):29-36.

208. Gleizal A, Li S, Pialat JB, & Beziat JL (2006) Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low-intensity ultrasound: an in vitro study. *Ultrasound in medicine & biology* 32(10):1569-1574.
209. Tang CH, *et al.* (2006) Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts. *Molecular pharmacology* 69(6):2047-2057.
210. Louw TM, Budhiraja G, Viljoen HJ, & Subramanian A (2013) Mechanotransduction of ultrasound is frequency dependent below the cavitation threshold. *Ultrasound in medicine & biology* 39(7):1303-1319.
211. Pitt WG & Ross SA (2003) Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology progress* 19(3):1038-1044.
212. Park H, *et al.* (2010) Indirect low-intensity ultrasonic stimulation for tissue engineering. *Journal of tissue engineering* 2010:973530.
213. Ito M, Azuma Y, Ohta T, & Komoriya K (2000) Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound in medicine & biology* 26(1):161-166.
214. Ebisawa K, *et al.* (2004) Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering* 10(5-6):921-929.
215. Gilly FN, *et al.* (1991) Intra-Peritoneal Chemo-Hyperthermia (CHIP): a new therapy in the treatment of the peritoneal seedings. Preliminary report. *International surgery* 76(3):164-167.
216. Dewey WC, Thrall DE, & Gillette EL (1977) Hyperthermia and radiation--a selective thermal effect on chronically hypoxic tumor cells in vivo. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2(1-2):99-103.
217. Kong G, Braun RD, & Dewhirst MW (2001) Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer research* 61(7):3027-3032.
218. Friedl J, Turner E, & Alexander HR, Jr. (2003) Augmentation of endothelial cell monolayer permeability by hyperthermia but not tumor necrosis factor: evidence for disruption of vascular integrity via VE-cadherin down-regulation. *International journal of oncology* 23(3):611-616.
219. Yudina A & Moonen C (2012) Ultrasound-induced cell permeabilisation and hyperthermia: strategies for local delivery of compounds with intracellular mode of action. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 28(4):311-319.
220. Roti Roti JL (2008) Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 24(1):3-15.
221. Coss RA, Dewey WC, & Bamburg JR (1982) Effects of hyperthermia on dividing Chinese hamster ovary cells and on microtubules in vitro. *Cancer research* 42(3):1059-1071.
222. Hildebrandt B, *et al.* (2002) The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical reviews in oncology/hematology* 43(1):33-56.
223. Kong G & Dewhirst MW (1999) Hyperthermia and liposomes. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 15(5):345-370.

224. Song CW (1984) Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer research* 44(10 Suppl):4721s-4730s.
225. Iwata K, *et al.* (1996) Tumour pO₂ can be increased markedly by mild hyperthermia. *The British journal of cancer. Supplement* 27:S217-221.
226. Lefor AT, Makohon S, & Ackerman NB (1985) The effects of hyperthermia on vascular permeability in experimental liver metastasis. *Journal of surgical oncology* 28(4):297-300.
227. Liu P, Zhang A, Xu Y, & Xu LX (2005) Study of non-uniform nanoparticle liposome extravasation in tumour. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 21(3):259-270.
228. Nishimura Y, *et al.* (1988) Microangiographic and histologic analysis of the effects of hyperthermia on murine tumor vasculature. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 15(2):411-420.
229. Watson KD, *et al.* (2012) Ultrasound increases nanoparticle delivery by reducing intratumoral pressure and increasing transport in epithelial and epithelial-mesenchymal transition tumors. *Cancer research* 72(6):1485-1493.
230. Loverock P, ter Haar G, Ormerod MG, & Imrie PR (1990) The effect of ultrasound on the cytotoxicity of adriamycin. *The British journal of radiology* 63(751):542-546.
231. Saito K, *et al.* (1999) Plasma membrane disruption underlies injury of the corneal endothelium by ultrasound. *Experimental eye research* 68(4):431-437.
232. Saad AH & Hahn GM (1989) Ultrasound enhanced drug toxicity on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cancer research* 49(21):5931-5934.
233. Starritt HC, Duck FA, & Humphrey VF (1989) An experimental investigation of streaming in pulsed diagnostic ultrasound beams. *Ultrasound in medicine & biology* 15(4):363-373.
234. Chen CC, *et al.* (2013) Targeted drug delivery with focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening using acoustically-activated nanodroplets. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 172(3):795-804.
235. Wu SY, *et al.* (2014) Transcranial cavitation detection in primates during blood-brain barrier opening--a performance assessment study. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control* 61(6):966-978.
236. McCreery TP, Sweitzer RH, & Unger EC (2004) DNA delivery to cells in culture using ultrasound. *Methods in molecular biology* 245:287-292.
237. McCreery TP, Sweitzer RH, Unger EC, & Sullivan S (2004) DNA delivery to cells in vivo by ultrasound. *Methods in molecular biology* 245:293-298.
238. Barry BW (2001) Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 14(2):101-114.
239. Bekeradjian R, Chen S, Pan W, Grayburn PA, & Shohet RV (2004) Effects of ultrasound-targeted microbubble destruction on cardiac gene expression. *Ultrasound in medicine & biology* 30(4):539-543.
240. Mestas JL, *et al.* (2014) Therapeutic efficacy of the combination of doxorubicin-loaded liposomes with inertial cavitation generated by confocal ultrasound in AT2 Dunning rat tumour model. *Journal of drug targeting*.
241. Wolloch L, *et al.* (2014) Fetal Membrane Transport Enhancement Using Ultrasound for Drug Delivery and Noninvasive Detection. *Pharmaceutical research*.
242. Mitragotri S (2005) Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nature reviews. Drug discovery* 4(3):255-260.

243. Sawai Y, *et al.* (2012) Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteosarcoma and cancer cells. *Oncology reports* 28(2):481-486.
244. Daubine F, *et al.* (2009) Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for bone metastasis prevention. *Biomaterials* 30(31):6367-6373.
245. Swami A, *et al.* (2014) Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(28):10287-10292.
246. Staruch R, Chopra R, & Hynynen K (2012) Hyperthermia in bone generated with MR imaging-controlled focused ultrasound: control strategies and drug delivery. *Radiology* 263(1):117-127.
247. Liu Y, *et al.* (2014) Ultrasound treatment for accelerating fracture healing of the distal radius. A control study. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 29(11):765-770.
248. Davidson F (1991) Ultrasonic power balances. *Output measurements for medical ultrasound* Springer Verlag, Berlin.
249. Peyruchaud O, *et al.* (2001) Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16(11):2027-2034.
250. Weiss HM, *et al.* (2008) Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 36(10):2043-2049.
251. Chen T, *et al.* (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *Journal of clinical pharmacology* 42(11):1228-1236.
252. Jauhiainen M, Monkkonen H, Raikkonen J, Monkkonen J, & Auriola S (2009) Analysis of endogenous ATP analogs and mevalonate pathway metabolites in cancer cell cultures using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 877(27):2967-2975.
253. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, & Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal* 377(Pt 1):159-169.
254. Leskinen JJ & Hynynen K (2012) Study of factors affecting the magnitude and nature of ultrasound exposure with in vitro set-ups. *Ultrasound in medicine & biology* 38(5):777-794.
255. Larkin JO, *et al.* (2008) Effective tumor treatment using optimized ultrasound-mediated delivery of bleomycin. *Ultrasound in medicine & biology* 34(3):406-413.
256. Meijering BD, *et al.* (2009) Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circulation research* 104(5):679-687.
257. Daubine F, Le Gall C, Gasser J, Green J, & Clezardin P (2007) Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 99(4):322-330.
258. Roelofs AJ, *et al.* (2012) Influence of bone affinity on the skeletal distribution of fluorescently labeled bisphosphonates in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27(4):835-847.

259. Melani C, Sangaletti S, Barazzetta FM, Werb Z, & Colombo MP (2007) Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer research* 67(23):11438-11446.
260. Clyburn RD, Reid P, Evans CA, Lefley DV, & Holen I (2010) Increased anti-tumour effects of doxorubicin and zoledronic acid in prostate cancer cells in vitro: supporting the benefits of combination therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65(5):969-978.
261. Neville-Webbe HL, Coleman RE, & Holen I (2010) Combined effects of the bisphosphonate, zoledronic acid and the aromatase inhibitor letrozole on breast cancer cells in vitro: evidence of synergistic interaction. *British journal of cancer* 102(6):1010-1017.
262. Rack B, *et al.* (2010) Effect of zoledronate on persisting isolated tumour cells in patients with early breast cancer. *Anticancer research* 30(5):1807-1813.
263. Skovsgaard T & Nissen NI (1982) Membrane transport of anthracyclines. *Pharmacology & therapeutics* 18(3):293-311.
264. Kiyomiya K, Matsuo S, & Kurebe M (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer research* 61(6):2467-2471.
265. Studzian K, *et al.* (2001) Inhibition of RNA synthesis in vitro and cell growth by anthracycline antibiotics. *Neoplasma* 48(5):412-418.
266. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, & Liu LF (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226(4673):466-468.
267. Milano G, *et al.* (1992) Doxorubicin weekly low dose administration: in vitro cytotoxicity generated by the typical pharmacokinetic profile. *European journal of cancer* 28A(11):1881-1885.
268. Tidefelt U, Sundman-Engberg B, & Paul C (1991) Intracellular uptake and cytotoxic effect in vitro of doxorubicin and epirubicin in human leukemic and normal hematopoietic cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 29(1):7-12.
269. Lee K, *et al.* (2009) Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(7):2353-2358.
270. Cusack BJ, Young SP, Driskell J, & Olson RD (1993) Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 32(1):53-58.
271. Pulaski BA & Ostrand-Rosenberg S (2001) Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 20:Unit 20 22.
272. Ottewell PD, *et al.* (2014) Zoledronic acid has differential antitumor activity in the pre- and postmenopausal bone microenvironment in vivo. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20(11):2922-2932.
273. Tower RJ, *et al.* (2014) Binding kinetics of a fluorescently labeled bisphosphonate as a tool for dynamic monitoring of bone mineral deposition in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29(9):1993-2003.
274. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, & Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical

- efficacy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 19(6):733-759.
275. Mitrofan LM, Pelkonen J, & Monkkonen J (2009) The level of ATP analog and isopentenyl pyrophosphate correlates with zoledronic acid-induced apoptosis in cancer cells in vitro. *Bone* 45(6):1153-1160.
 276. Ural AU, *et al.* (2003) The bisphosphonate zoledronic acid induces cytotoxicity in human myeloma cell lines with enhancing effects of dexamethasone and thalidomide. *International journal of hematology* 78(5):443-449.
 277. Apodaca G (2002) Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *American journal of physiology. Renal physiology* 282(2):F179-190.
 278. Hafeman S, London C, Elmslie R, & Dow S (2010) Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59(3):441-452.
 279. Chebbi I, Migianu-Griffoni E, Sainte-Catherine O, Lecouvey M, & Seksek O (2010) In vitro assessment of liposomal neridronate on MDA-MB-231 human breast cancer cells. *International journal of pharmaceutics* 383(1-2):116-122.
 280. Shmeeda H, *et al.* (2010) Delivery of zoledronic acid encapsulated in folate-targeted liposome results in potent in vitro cytotoxic activity on tumor cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 146(1):76-83.
 281. Anada T, Takeda Y, Honda Y, Sakurai K, & Suzuki O (2009) Synthesis of calcium phosphate-binding liposome for drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19(15):4148-4150.
 282. Wu D & Wan M (2012) Methylene diphosphonate-conjugated adriamycin liposomes: preparation, characteristics, and targeted therapy for osteosarcomas in vitro and in vivo. *Biomedical microdevices* 14(3):497-510.
 283. Rogers TL, *et al.* (2013) Macrophages as potential targets for zoledronic acid outside the skeleton-evidence from in vitro and in vivo models. *Cellular oncology* 36(6):505-514.
 284. Junankar S, *et al.* (2015) Real-time intravital imaging establishes tumor-associated macrophages as the extraskelatal target of bisphosphonate action in cancer. *Cancer discovery* 5(1):35-42.
 285. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, & Kleeff J (2010) Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Experimental oncology* 32(3):128-131.